

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Frank Dombrowski)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: Einfluss des Transkriptionsfaktors Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) auf die Pathogenese der Glykogenspeicherung und Karzinogenese in Nierentubuli bei diabetischen Wildtyp- und ChREBP-Knockout- Mäusen im Rahmen des Pankreasinseltransplantationsmodells

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen  
Grades  
Doktor der Medizin  
(Dr. med.)  
der  
Universitätsmedizin  
der  
Universität Greifswald

2021

Eingereicht von: Christian Klaus Burkert  
geboren am: 14.10.1992  
in: Bremen

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Silvia Ribback

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Arndt Hartmann

Ort: Greifswald, Institut für Pathologie

Tag der Disputation: 13.10.2022

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
Symbol- & Abkürzungsverzeichnis.....	VII
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Fragestellung.....</b>	<b>2</b>
<b>3 Grundlagen und Stand der Forschung .....</b>	<b>3</b>
3.1 Glukose-Stoffwechsel innerhalb des renalen Tubulusepithels.....	3
3.2 Carbohydrate-response-element-binding Protein (ChREBP) .....	4
3.2.1 Struktureller Aufbau .....	4
3.2.2 Isoformen von ChREBP .....	6
3.2.3 Zielgene von ChREBP.....	6
3.2.4 Regulation von ChREBP.....	6
3.2.5 Organspezifische Bedeutung von ChREBP.....	9
3.2.6 Einfluss von ChREBP auf die Tumorgenese.....	11
3.3 Intraportales Pankreasinseltransplantationsmodell.....	13
3.4 Diabetes mellitus.....	13
3.4.1 Einteilung .....	14
3.4.2 Pathobiochemie .....	15
3.4.3 Pathologische Veränderungen der Niere.....	15
3.5 Glykogenspeicherung .....	16
3.5.1 Synthese von Glykogen.....	16
3.5.2 Formen .....	17
3.5.3 Vorkommen in der Niere und anderen Geweben.....	17
<b>4 Material und Methode .....</b>	<b>20</b>
4.1 Versuchsrahmenbedingungen .....	20
4.1.1 verwendete Tierstämme.....	20
4.1.2 Versuchsgruppen.....	20
4.1.3 Streptozotocin-induzierter Insulinmangeldiabetes.....	21
4.1.4 Tierhaltung.....	22
4.2 Isolation der Pankreasinseln .....	22
4.2.1 Anfärbung und Organentnahme .....	22
4.2.2 Zerschnitt und enzymatischer Verdau .....	22
4.2.3 Isolation der Pankreasinseln.....	23
4.3 Inseltransplantation .....	23
4.3.1 Vorbereitung des Transplantationssystems .....	23
4.3.2 Transplantation der Pankreasinseln .....	24

4.4	Verlaufskontrolle und Überwachung des Wohlbefindens .....	24
4.4.1	Implantation von Insulinsticks .....	25
4.5	Versuchsende- Perfusion und Fixation .....	25
4.5.1	Applikation von 5-Bromo-2 <sup>de</sup> soxyuridin.....	25
4.5.2	Perfusion und Fixation.....	25
4.5.3	Organ- und Gewebentnahme .....	26
4.6	Zuschnitt- weiterführende Verarbeitung der Proben .....	27
4.7	Paraffineinbettung und Anfertigung histologischer Schnitte .....	27
4.8	Auswertungsverfahren .....	27
4.8.1	Glykogenotische Veränderungen .....	27
4.8.2	Proliferationsaktivität .....	29
4.8.3	Nierentumoren.....	29
4.9	Statistische Auswertung .....	30
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
5.1	Blutzucker .....	31
5.1.1	C57BL/6J-Wildtyp-Stamm bei 3-monatiger Versuchsdauer .....	31
5.1.2	ChREBP-Knockout-Stamm bei 3-monatiger Versuchsdauer .....	31
5.1.3	Vergleich zwischen C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm bei drei Monaten Versuchsdauer.....	31
5.1.4	C57BL/6J-Wildtyp-Stamm bei 6-monatiger Versuchsdauer .....	32
5.1.5	ChREBP-Knockout-Stamm bei 6-monatiger Versuchsdauer.....	32
5.1.6	Vergleich zwischen C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm bei sechs Monaten Versuchsdauer .....	33
5.2	Glykogenotische Veränderungen in der Niere .....	33
5.2.1	C57BL/6J-Wildtyp-Stamm nach 3- monatiger Versuchsdauer .....	33
5.2.2	ChREBP-Knockout-Stamm nach 3- monatiger Versuchsdauer.....	34
5.2.3	Glykogenotische Veränderungen bei C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP- Knockout-Stamm nach drei Monaten im Vergleich .....	34
5.2.4	C57BL/6J-Wildtyp-Stamm nach 6- monatiger Versuchsdauer .....	37
5.2.5	ChREBP-Knockout-Stamm nach 6- monatiger Versuchsdauer.....	37
5.2.6	Glykogenotische Veränderungen bei C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP- Knockout-Stamm nach sechs Monaten im Vergleich .....	37
5.2.7	Vergleich der unterschiedlichen Versuchszeiträume .....	40
5.3	Proliferationsaktivität des Tubulusepithels.....	42
5.3.1	C57BL/6J-Wildtyp-Stamm nach 3-monatiger Versuchsdauer .....	42
5.3.2	ChREBP-Knockout-Stamm nach 3-monatiger Versuchsdauer.....	42
5.3.3	Vergleich der Proliferationsaktivitäten von Wildtyp- und ChREBP- Knockout-Mäusen nach drei Monaten .....	42
5.3.4	C57BL/6J-Wildtyp-Stamm nach 6-monatiger Versuchsdauer .....	44
5.3.5	ChREBP-Knockout-Stamm nach 6-monatiger Versuchsdauer.....	44

5.3.6	Vergleich der Proliferationsaktivitäten vom C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP- Knockout-Mäusen nach sechs Monaten.....	44
5.3.7	Vergleich der unterschiedlichen Versuchszeiträume .....	45
5.4	Nierentumoren .....	46
5.4.1	Morphologie .....	46
5.4.2	Auftreten beim C57BL/6J-Wildtyp nach drei Monaten .....	47
5.4.3	Auftreten beim ChREBP-Knockout-Stamm nach drei Monaten.....	47
5.4.4	Vergleich zwischen dem C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm nach drei Monaten.....	49
5.4.5	Auftreten beim C57BL/6J-Wildtyp nach sechs Monaten.....	49
5.4.6	Auftreten beim ChREBP-Knockout-Stamm nach sechs Monaten.....	51
5.4.7	Vergleich zwischen dem C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm nach sechs Monaten.....	53
5.4.8	Vergleich zwischen den unterschiedlichen Versuchszeiträumen .....	53
<b>6</b>	<b>Ergebnisdiskussion.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>65</b>
	Literaturverzeichnis .....	66
	Anhang .....	78
A	Pathobiochemie beim Diabetes mellitus .....	78
B	Score zur Überwachung des Wohlbefindens von Versuchstieren.....	79
C	Herstellung der Perfusionslösungen.....	80
C.1	Spüllösung .....	80
C.2	Fixationslösung .....	80
C.3	Nachfixationslösung .....	81
D	Protokoll zur Durchführung der PAS-Reaktion .....	82
E	Protokoll zur Durchführung der BrdU-Reaktion (mit PAS-Reaktion).....	83
F	allgemeine Versuchsmaterialien I.....	85
F.1	allgemeine Versuchsmaterialien II.....	86
G	Materialien: Tierhaltung .....	87
H	Materialien: Operationsbesteck .....	87
I	Materialien: Chemikalien I .....	88
I.1	Chemikalien II.....	89

## Abbildungsverzeichnis

3.1	renale Glykolyse und Glukoneogenese und deren Lokalisation innerhalb der Niere...	4
3.2	ChREBP-Aufbau.....	5
3.3	Inhibition von ChREBP bei Glukosemangel.....	7
3.4	Aktivierung von ChREBP durch verschiedene Glukose-Metabolite .....	9
3.5	Struktur und Akkumulationsformen von Glykogen .....	17
3.6	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Armanni-Ebstein-Läsionen und Glykogenspeicherkerne .....	19
4.1	Auswertungsoberfläche und verwendetes Gesichtsfeld .....	28
5.1	HE-Färbung, PAS- und BrdU-Reaktion (kombiniert mit PAS) vom Nierenrindparenchym nach drei Monaten .....	36
5.2	HE-Färbung, PAS- und BrdU-Reaktion (kombiniert mit PAS) vom Nierenrindparenchym nach sechs Monaten .....	39
5.3	PAS-Reaktion mit AEL bei Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäusen nach 3 und 6 Monaten.....	41
5.4	Nierentumor eines drei Monate alten ChREBP-Knockout-Tieres.....	48
5.5	Nierentumor einer sechs Monate alten Wildtyp-Maus.....	50
5.6	Nierentumor eines sechs Monate alten ChREBP-Knockout-Tieres .....	52
A.1	schematische Darstellung der Pathobiochemie beim Diabetes mellitus .....	78

## Tabellenverzeichnis

4.1	Versuchsgruppen Wildtyp .....	21
4.2	Versuchsgruppen ChREBP-Knockout .....	21
5.1	BZ-Werte des Knockout- und Wildtyp-Stammes nach drei Monaten.....	32
5.2	BZ-Werte des Knockout- und Wildtyp-Stammes nach sechs Monaten .....	33
5.3	Vorkommen von Glykogenspeicherkernen im distalen Tubulusepithel nach 3 Monaten .....	35
5.4	Anteil von Armanni-Ebstein-Läsionen am ausgezählten Nierenparenchym nach 3 Monaten.....	35
5.5	Vorkommen von Glykogenspeicherkernen im distalen Tubulusepithel nach 6 Monaten .....	38
5.6	Anteil von Armanni-Ebstein-Läsionen am ausgezählten Nierenparenchym nach 6 Monaten.....	38
5.7	Proliferationsaktivität anhand des BrdU-LI vom renalen Tubulusepithel bei Wildtyp-Tieren nach 3 Monaten .....	43
5.8	Proliferationsaktivität anhand des BrdU-LI vom renalen Tubulusepithel bei Knockout-Tieren nach 3 Monaten .....	43
5.9	Proliferationsaktivität anhand des BrdU-LI vom renalen Tubulusepithel bei Wildtyp-Tieren nach 6 Monaten .....	45
5.10	Proliferationsaktivität anhand des BrdU-LI vom renalen Tubulusepithel bei Knockout-Tieren nach 6 Monaten .....	45
5.11	Auftreten von Nierentumoren bei ChREBP-Knockout Tieren nach 3 Monaten .....	47
5.12	Auftreten von Nierentumoren beim Wildtyp nach 6 Monaten .....	49
5.13	Auftreten von Nierentumoren bei ChREBP-Knockout Tieren nach 6 Monaten .....	51
B.1	Score zur Überwachung des Wohlbefindens .....	79
C.2	Zusammensetzung der Spüllösung .....	80
C.3	Zusammensetzung der Fixationslösung .....	80
C.4	Zusammensetzung der Nachfixationslösung .....	81
F.5	allgemeine Versuchsmaterialien I.....	85
F.6	allgemeine Versuchsmaterialien II.....	86
G.7	Tierhaltung.....	87
H.8	Operationsbesteck .....	87
I.9	Chemikalien I .....	88
I.10	Chemikalien II .....	89

# Symbol- & Abkürzungsverzeichnis

## Abkürzungen

Symbol	Bedeutung
AEL	Armanni-Ebstein-Läsion
AGE	advanced glycosylation endproducts
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte-Kinase
AS	Aminosäuren
bHLH/LZ	basic helix-loop-helix/leucine Zipper-Domain
BrdU	Bromdesoxyuridin
BZ	Blutzucker
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCF	clear cell foci, klarzellige Foci
ChoRE	carbohydrate-response element
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
CoA	Coenzym A
COX-2	Zyclooxygenase-2
diab.	diabetisch
DM	Diabetes mellitus
F2,6BP	Fruktose-2,6-Bisphosphat
FOXO1	Forkhead Box O1
FS	Fettsäuren
G1P	Glukose-1-Phosphat
G6-Pase	Glukose-6-Phosphatase
G6P	Glukose-6-Phosphat
GLUT 1-4	Glukosetransporter 1-4
GRACE	glucose-response activation conserved element
GSK	Glykogenspeicher Kern
GSM	glucose-sensing-module
HCC	hepatocellular carcinoma, Hepatozelluläres Karzinom
HDL	high density lipoprotein
ICA	islet cell antibodies, Inselzellantikörper
IPITM	intraportales Inseltransplantationsmodell
IR	Insulinrezeptor
IRS-1,-2	insulin receptor substrate 1, 2
kDA	Kilodalton
LID	low-glucose inhibitory domain



---

MAPK	Mitogen-activated-Proteinkinase
MLX	Max-like-Protein
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
NES-1	nuclear export signal-1
NES-2	nuclear export signal-2
NLS	nuclear localisation signal
OH-Gruppe	Hydroxygruppe
OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
PA	Proliferationsaktivität
PAI-1	plasminogen-activator-Inhibitor-1
PAS-Reaktion	Periodsäure-Schiff-Reaktion
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PPAR- $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
RNAi	RNA-Interferenz
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SGLT	Natrium-Glukose-Cotransporter
siRNA	Small interfering RNA
SREBP-1c/-2	Sterol Response Element Binding Protein 1c und 2
TAG	Triacylglycerid
TE	Tubulusepithel
TF	Transkriptionsfaktor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
Tx	Transplantation
UDP,UTP	Uridindiphosphat, Uridintriphosphat
UE	Untereinheit
USP	United States Pharmacopeia
VLDL	very low density lipoprotein
WT	Wildtyp
X5P	Xylulose-5-Phosphat

# 1 Einleitung

Der Diabetes mellitus stellt als chronisch-metabolische Erkrankung eine der größten gesellschaftlichen Herausforderungen dar und zählt zu den wichtigsten Ursachen für die allgemeine Morbidität sowie Mortalität. In Europa sind derzeit circa 58 Millionen Menschen erkrankt. Alleine in Deutschland leiden 7,5 Mio. Patienten an Diabetes. Es wird davon ausgegangen, dass es in den nächsten Jahren weltweit zu einer deutlichen Zunahme kommt [47]. Als chronische Erkrankung führt der Diabetes mellitus mittel- bzw. längerfristig zu Organ- und Gewebsschädigungen sowie zu schwerwiegenden Komplikationen beim Betroffenen. Insbesondere in den Nieren kommt es zu einer chronischen Schädigung mit Entstehung einer diabetischen Nephropathie. Dabei kommt es vor allem zur Zerstörung der Glomeruli (Glomerulosklerose), einer zunehmenden Arteriosklerose und schließlich zum Nierenversagen [104, 78]. Daneben treten auch tubuläre glykogenotische Veränderungen in Form von Armanni-Ebstein-Läsionen und Glykogenspeicherkerne auf. Die Ursache und Bedeutung dieser intrazytoplasmatisch bzw. nukleären Glykogenablagerungen ist noch weitgehend unklar [37, 95, 28, 109]. Es ist für das Verständnis der diabetischen Nephropathie wichtig, deren Entstehung und möglichen schädigenden Einfluss zu erforschen.

Außerdem scheint das Vorliegen eines Diabetes mit einem erhöhten Risiko für Tumorerkrankungen sowie einer gesteigerten Mortalität durch Karzinome (u.a. Leber, Pankreas, Magen und Niere) assoziiert zu sein [14, 117, 115]. Insbesondere der Diabetes mellitus Typ 2 scheint mit einem erhöhten Malignomrisiko einherzugehen [96]. Neben dem Bestehen einer Hyperinsulinämie und den Insulin vermittelten promotischen Effekte spielt auch das Bestehen einer Hyperglykämie, u.a. durch Beeinflussung der Tumorpheriferation, des Apoptoseverhaltens sowie der invasiven Wachstumseigenschaften, eine Rolle [115, 96]. Die genauen Mechanismen oder Zusammenhänge sind allerdings noch unklar und bedürfen einer weiteren Untersuchung.

Der Transkriptionsfaktor ChREBP, der zunehmend im Fokus der aktuellen Forschung steht, ist ein zentraler Regulator des Fett- und Glukosestoffwechsels. Die durch ihn beeinflussten Stoffwechselprozesse und -vorgänge sowie die durch ein ChREBP-Knockout resultierenden metabolischen Veränderungen werden insbesondere in der Leber, Fettgewebe und Pankreas untersucht [43, 44, 1]. In den Nieren ist er bislang im Vergleich zu ersteren noch relativ unerforscht [55, 127]. Die Nieren stellen ein zentrales Organ der Glukose-Homöostase, u.a. durch die Glukoseresorption und Glukoneogenese, dar, auf die ChREBP regulatorisch Einfluss nehmen könnte. Gleichzeitig könnte ChREBP aufgrund seiner metabolischen Funktionen auch zur Entstehung und dem Fortschreiten eines Diabetes mellitus beitragen. Schließlich nimmt ChREBP Einfluss auf das Wachstum und die Tumorentstehung von verschiedenen Geweben wie Leber, Prostata und Kolon/Rektum [111, 52, 94, 92]. ChREBP könnte daher auch innerhalb der Niere zu einer veränderten Proliferation und Tumorentstehung führen. Daher ist es sinnvoll, die renale Bedeutung des Transkriptionsfaktor ChREBP zu untersuchen.

## 2 Fragestellung

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit ist es, im Rahmen von Langzeitversuchen (Versuchszeitraum: 3 Monate und 6 Monate) die Auswirkungen eines länger bestehenden Diabetes mellitus auf das renale Tubulusepithel in Mäusen zu untersuchen. Dazu wird das Auftreten von glykogenotischen Veränderungen in den Tubuli untersucht. Als Parameter dafür dienen der intrazytoplasmatische Glykogengehalt in Form von Armanni-Ebstein-Läsionen sowie das Auftreten von Glykogenspeicherkernen als intranukleäre Glykogeneinlagerungen. Es wird überprüft, inwieweit sich die diabetische Stoffwechsellage, die durch regelmäßige Blutzucker-Messungen kontrolliert wird, auf die Proliferationsaktivität des renalen Tubulusepithels auswirkt und ob bei diabetischen Mäusen manifeste Nierentumoren auftreten. Hierbei wird angenommen, dass der Diabetes sowohl zu einer erhöhten Proliferationsaktivität führt als auch verstärkt zur Entstehung von renalen Tumoren beiträgt.

In diesem Zusammenhang soll geprüft werden, ob die oben beschriebenen diabetischen Veränderungen des renalen Tubulusepithels durch das Ausschalten des Transkriptionsfaktors ChREBP als wichtiger Regulator des Glukose- und Fettstoffwechsels beeinflusst werden. Weiterhin stellt sich die Frage, ob der Knockout von ChREBP bzw. die damit verbundenen Auswirkungen auf den Stoffwechsel auch Einfluss auf die tubuluäre Proliferationsaktivität sowie auf die Tumorgenese haben. Dabei wird aufgrund der Tatsache, dass ChREBP in unterschiedlichen Geweben bislang vor allem protoonkogene Eigenschaften besitzt, davon ausgegangen, dass in der Niere das Ausschalten von ChREBP zu einer verringerten Tumorbildung, vor allem bei Bestehen eines Diabetes, führen könnte. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen einem Knockout von ChREBP, Diabetes sowie neoplastischen Läsionen zu evaluieren, werden im Rahmen dieser Arbeit ChREBP-Knockout Mäuse mit Wildtyp-Mäusen (C57BL/6J) verglichen.

Schließlich soll überprüft werden, ob eine intraportale Transplantation von Pankreasinseln neben den hepatischen Auswirkungen auch auf das renale Tubulusepithel bzw. auf die bereits genannten Parameter Einfluss nimmt. Es wird bei der Hälfte der Mäuse eine Inseltransplantation durchgeführt und evaluiert, inwieweit sich diese auf den Blutzucker, Bildung von Glykogenosen im renalen Tubulusepithel sowie dessen Wachstumsverhalten bzw. Tumorgenese auswirkt.

## 3 Grundlagen und Stand der Forschung

### 3.1 Glukose-Stoffwechsel innerhalb des renalen Tubulusepithels

Die Niere spielt neben ihrer lebenswichtigen Funktion als Filter- und Ausscheidungsorgan eine wichtige Rolle bei der Glukose-Homöostase. Während der Nüchternphase werden im Körper jeweils circa 50 % der Glukose durch Glykogenolyse (nur Leber) und Glukoneogenese (Leber und Niere) freigesetzt. Davon werden etwa 20-25 % mittels Glukoneogenese durch die Nieren gebildet [32, 107]. Nach Erschöpfen der hepatischen Glykogenreserven bei anhaltender Nahrungskarenz stellt die Niere bis zu 40 % der neu synthetisierten Glukose bereit [32, 109]. Anders als in der Leber findet selbst in der postprandialen Phase eine verstärkte renale Glukoneogenese und Glukosefreisetzung statt [108, 75, 32]. Hauptort der renalen Glukoneogenese ist das proximale Tubulusepithel. Wichtige Enzyme der Glukoneogenese wie Glukose-6-Phosphatase (G6-Pase) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) werden vor allem in den proximalen Tubuluszellen exprimiert [97]. Als Ausgangsstoffe dienen vor allem Laktat, aber auch Glutamin sowie Glycerin [32, 107, 108]. Siehe dazu Abb. 3.1. Die Glukoneogenese in der Niere wird durch Insulin, insbesondere über die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors (TF) FOXO-1, inhibiert [97, 70]. Katecholamine führen (direkt und indirekt über Hemmung von Insulin) zu einer Verstärkung, während Glukagon keinen Einfluss auf die renale Glukosebildung hat [76, 32].

Quantitativ findet im proximalen Tubulus der größte Anteil der Rückresorption statt. Insbesondere die Wiederaufnahme von Glukose aus dem Primärharn mittels den Natrium-Glukose-Cotransportern 1 und 2 (SGLT-1/-2), die im proximalen Tubulus ist eine wichtige Funktion für die Glukose-Homöostase [101, 97]. Um die dafür nötige Energie aufbringen zu können, weisen distale und proximale Tubuluszellen eine hohe Anzahl an ATPasen und Mitochondrien auf [34, 16]. Im renalen Cortex findet vor allem die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren statt. Die proximalen Tubuluszellen betreiben kaum Glykolyse zur Energiegewinnung. Aufgrund des deutlich schlechteren Sauerstoffangebotes sind die medullär gelegenen Zellen zwingend auf die anerobe Glykolyse angewiesen [107, 32, 128]. Siehe dazu Abb. 3.1.

Unter physiologischen Bedingungen enthält die Niere fast kein Glykogen [107, 32, 109]. Es kommen allerdings Zellen vor, die die Fähigkeit zur Glykogenbildung besitzen. Sie zeigen jedoch nur geringe Mengen der G6-Pase, sodass eine Freisetzung wie seitens der Leber nicht möglich ist [32, 107, 70]. Bei Vorliegen eines Diabetes mellitus kommt es jedoch zu einer starken Akkumulation von Glykogen (siehe dazu Kapitel 3.6). Zudem werden die Stoffwechselprozesse im Tubulusepithel verändert. Es kommt aufgrund des Insulinmangels bzw. zunehmenden Insulinresistenz sowie einem Überangebot an Substraten zu einer deutlichen Steigerung der renalen Glukoneogenese und Glukoseaufnahme in die Nieren. Dabei wird absolut gesehen renal ähnlich viel Glukose freigesetzt wie aus der Leber. Im Vergleich zu einer nicht-diabetischen Stoffwechsellaage fällt der renale Anstieg der Glukosefreisetzung deutlich größer (renal= 300 %; hepatisch= 30 %) aus [76, 32, 109].

Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass bei bestehender Hyperglykämie durch die zunehmende Expression von SGLT und dadurch vermehrte Glukoserückresorption die Expression glukoneogenetischer Enzyme in der Niere gehemmt wird [97]. Zudem steigt bereits im Frühstadium der Sauerstoffverbrauch stark an, sodass die proximalen Tubuluszellen ihren Metabolismus infolge des Sauerstoffmangels vermehrt auf eine Glukose-basierte Energiegewinnung wie Glykolyse und oxidative Phosphorylierung umstellen [16, 109].

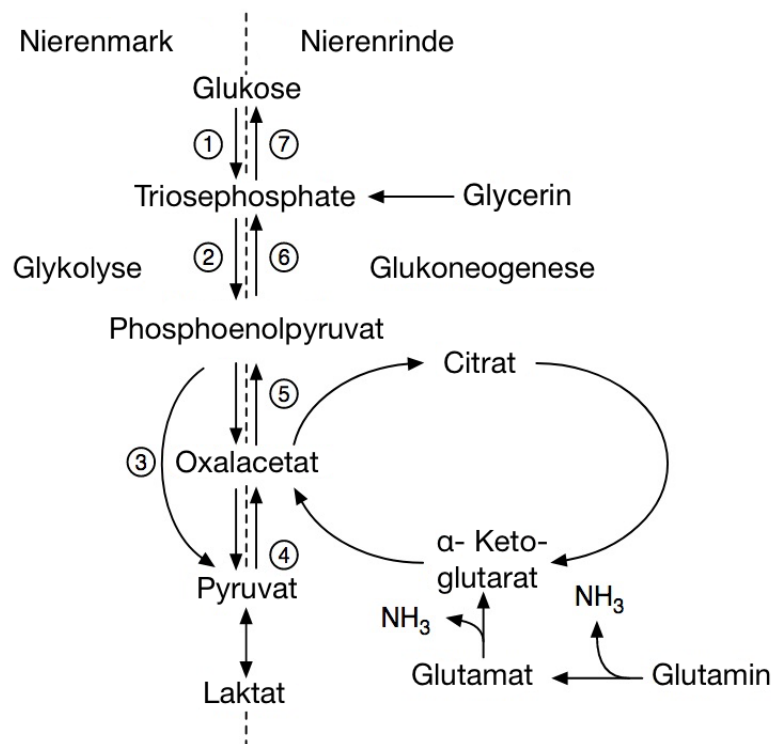


Abbildung 3.1: renale Glykolyse und Glukoneogenese und deren Lokalisation innerhalb der Niere. In der Medulla findet vor allem die Glykolyse statt, sodass deren Schlüsselenzyme Hexokinase (1), Phosphofruktokinase (2) und Pyruvatkinase (3) insbesondere in den medulären Zellen zu finden sind. Die Glukoneogenese wird in den Zellen der Nierenrinde betrieben, sodass hier vor allem gluconeogenetischen Enzyme (Pyruvatcarboxylase (4), Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (5), Fructose-1,6-Bisphosphatase und Glukose-6-Phosphatase) lokalisiert sind. Entnommen (modifiziert) aus [107]

## 3.2 Carbohydrate-response-element-binding Protein (ChREBP)

### 3.2.1 Struktureller Aufbau

Das Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) ist ein ca. 95 kDa, aus 864 Aminosäuren (AS) bestehender Transkriptionsfaktor (TF), der je nach Aktivität sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus von Zellen unterschiedlicher Gewebe wie Leber, Pankreas und Niere nachweisbar ist. Er spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Glucose- und Fettstoffwechsels und ist essentieller Bestandteil bei der Anpassung des Organismus an unterschiedliche Stoffwechselsituationen wie Nahrungskarenz oder -überschuss durch Veränderung

der Genexpression in den jeweiligen Organen [1, 44].

ChREBP verfügt an seinem N-terminalen Ende über zwei nuclear export signals (NES-1 und NES-2) sowie über ein nuclear localisation signal (NLS), die durch Binden von nukleären TF (14-3-3-Proteine, CRM-1/Exportin-1, Importinen) den intrazellulären Aufenthaltsort (Nukleus oder Zytoplasma) und so die Aktivität von ChREBP beeinflussen [29, 43, 1]. ChREBP beinhaltet ein intramolekulares glucose-sensing-module (GSM). Dieses besteht aus einer low-glucose inhibitory domain (LID, AS 37-192) und einem glucose-response activation conserved element (GRACE, AS 197-298). Diese regulieren je nach Glukoseangebot die Aktivität von ChREBP durch gegenseitige Wechselwirkung: Bei niedrigen Glukosekonzentrationen wird die Transkriptionsaktivität des GRACE durch LID blockiert und ChREBP verbleibt in inaktiver Form im Zytoplasma. Steigt der Glukosespiegel dagegen an, so wird diese Inhibition aufgehoben [19, 18, 44, 1].

Das GSM lässt sich in sechs (I-VI) Untereinheiten (UE) unterteilen. Dabei korrespondieren die UE I bis IV mit der LID, während das GRACE mit den UE V und VI assoziiert ist. Die UE VI stellt vermutlich eine Bindungsstelle für Glukose-abgeleitete Metabolite dar, die so die Aktivität von ChREBP beeinflussen können. [43, 1].

Am C-Terminus befindet sich eine mit DNA interagierende basic helix-loop-helix/leucine Zipper-Domäne (bHLH/LZ), über die ChREBP mit dem Max-like-Protein (MLX) ein Heterodimer bilden kann. Als Heterodimer binden sie an das carbohydrate-response element (ChoRE), einem DNA-Regulatorelement innerhalb der Promotorregion zahlreicher Glukose-sensitiver Gene [106, 68, 43, 122]. Schematisch wird der Aufbau von ChREBP in Abbildung 3.2 dargestellt.

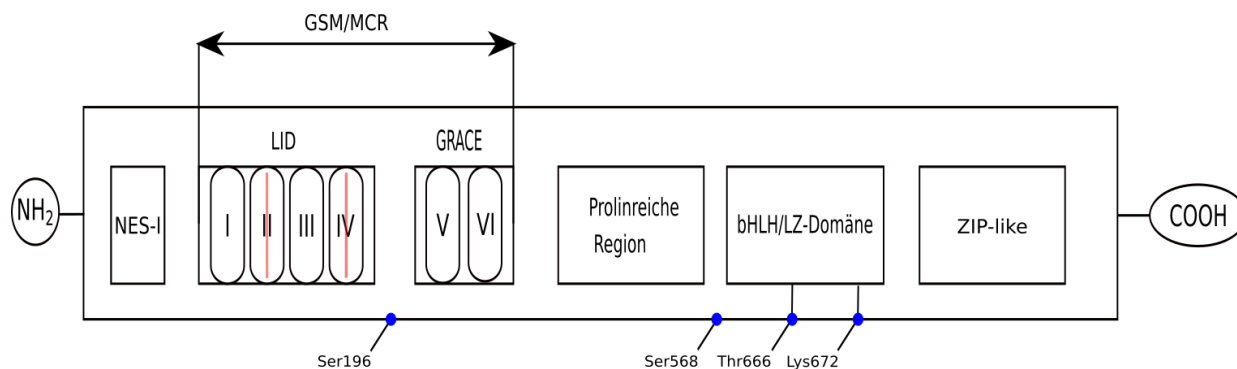


Abbildung 3.2: schematischer Aufbau des Transkriptionsfaktors ChREBP (Isoform- $\alpha$ ). Am N-Terminus (NH<sub>2</sub>) sind das regulatorisch wirkende GSM, bestehend aus der LID (I-IV) und GRACE (V und VI) sowie die NES-1 lokalisiert. Über eine Prolinreiche Region folgt am C-Terminus (COOH) die bHLH/LZ-Domäne über die ChREBP mit dem MLX-Protein ein Heterodimer bilden und als TF aktiv werden kann. Außerdem sind die AS und deren Position (blaue Punkte) dargestellt, die durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung ChREBP regulieren. ChREBP verfügt über eine NES-2 (II, rot) und NLS (IV, rot). Einzelheiten siehe Text. GSM, glucose-sensing-module; LID, low-glucose inhibitory domain; GRACE, glucose-response activation conserved element; NES, nuclear export signal site; NLS, nuclear localization signal I-VI: Untereinheiten. Modifiziert nach [122]

### 3.2.2 Isoformen von ChREBP

Der Transkriptionsfaktor ChREBP kommt nach bisherigen Erkenntnissen in zwei Isoformen vor: ChREBP- $\alpha$  und ChREBP- $\beta$ . Beide Formen unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur und Funktion als auch in ihrem Vorkommen [35]. ChREBP- $\alpha$  ist wie oben beschrieben aufgebaut. Die  $\beta$ -Isoform ist ein kleineres Protein (72kDA, 687 AS) und entsteht u.a. durch Verwendung eines alternativen Promotors des ChREBP-Gens und Splicings der Prä-mRNA. Dadurch fehlt ChREBP- $\beta$  die LID des GSM, sodass es selbst bei niedrigen Glukosekonzentrationen konstitutiv aktiv und nur im Nukleus lokalisiert ist, während ChREBP- $\alpha$  je nach Glukosespiegel und entsprechender LID/GRACE- Interaktion (s.o) im Zytosol (inaktiv) oder Nukleus (aktiv) vorkommt [44, 1].

ChREBP- $\beta$  zeigt im Vergleich zur  $\alpha$ -Isoform eine verringerte Expression in Leber, weißem Fettgewebe sowie Pankreas. Es ist anzunehmen, dass die Isoformen sich gegenseitig beeinflussen und beide essentiell für eine suffiziente ChREBP-vermittelte Expression Glukosesensitiver Gene sind [43, 44, 1].

### 3.2.3 Zielgene von ChREBP

Der TF ChREBP als zentraler Regulator des Glukose- und Fettstoffwechsel beeinflusst die Genexpression einer Vielzahl daran beteiligter Enzyme. Er kontrolliert die zelluläre Glukoseaufnahme, Glykolyse, Glukoneogenese, den Pentosephosphatweg sowie die de-novo-Lipogenese. Im Rahmen einer an männlichen Mäusen durchgeführten genomweiten Analyse anhand hepatischen und adipösen Chromatins konnten 5825 solcher Gene in der Leber, 2418 Gene im weißem Fettgewebe und 5919 Gene, die in beiden Geweben vertreten sind, gefunden werden. Davon ist ein Großteil in metabolische Prozesse eingebunden [86]. Desweiteren gewinnt ChREBP auch über die Expression von anderen TF Einfluss auf die verschiedenen Stoffwechselwege. Beispielsweise hemmt ChREBP die Expression des Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- $\alpha$ ) [44]. Dieser wird vor allem in der Leber, Skelettmuskulatur sowie im Herzen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und der Ketonkörpersynthese [22].

### 3.2.4 Regulation von ChREBP

ChREBP als zentraler Regulator des Lipid- und Glukosemetabolismus unterliegt selbst einer Kontrolle, die eng mit zahlreichen Stoffwechselfvorgängen assoziiert ist. Dabei wird ChREBP durch unterschiedliche Mechanismen reguliert, die dessen intrazelluläre Lokalisation (Zytoplasma, Kern), DNA-Bindefähigkeit sowie dessen Transkriptionsaktivität beeinflussen.

**Inhibition** ChREBP kann posttranslational über Phosphorylierung in seiner Aktivität gehemmt werden. Bei Nahrungskarenz bzw. mangelhafter Glukoseverfügbarkeit sinkt der Blutglukosespiegel. Als Reaktion werden Glukagon (Pankreas) sowie Katecholamine (Nebennierenmark) freigesetzt und die Ausschüttung von Insulin gehemmt. Glukagon führt Rezeptor-

vermittelt über Stimulation der Adenylatzyklase zu einem intrazellulären Anstieg an cAMP, das die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Dieses Enzym reguliert über Phosphorylierung zahlreicher Enzyme des Glykogenstoffwechsels, der Glukoneogenese sowie Lipolyse [22]. Eine Phosphorylierung von ChREBP durch die PKA am Threonin an Position 666 - ein Bestandteil der DNA-Bindungsdomäne- führt zur Verlust der DNA-Bindefähigkeit, während eine Phosphorylierung des Serin-Rests an Position 196 zu dessen Retention im Zytoplasma führt [43, 44, 1]. Bei Energiemangel kommt es zur intrazellulären Akkumulation von AMP als Zeichen eines ATP-Mangels. Dadurch wird die AMP-aktivierte-Kinase (AMPK) induziert. Diese phosphoryliert ChREBP am Serin-Rest an Position 568, sodass der TF seine Promotorbindefähigkeit verliert [43, 44, 1]. Andere einen Hungerzustand anzeigende Metabolite wie AMP und aus der  $\beta$ -Oxidation resultierende Ketonkörper scheinen ChREBP allosterisch zu hemmen, indem sie dessen Konformation und seine Affinität zu 14-3-3-Proteinen erhöhen und zur Retention von CHREBP im Zytoplasma führen [98]. In Hungerzuständen wird durch die verminderte Freisetzung von Insulin der Transkriptionsfaktor FOXO1 aktiviert. Dieser reduziert die Aktivität und Stabilität von ChREBP, indem er den Grad der O-GlcNacetylierung (s.u.) senkt [42]. Eine Übersicht über die wichtigsten inhibierenden Prozesse bietet Abb. 3.3.

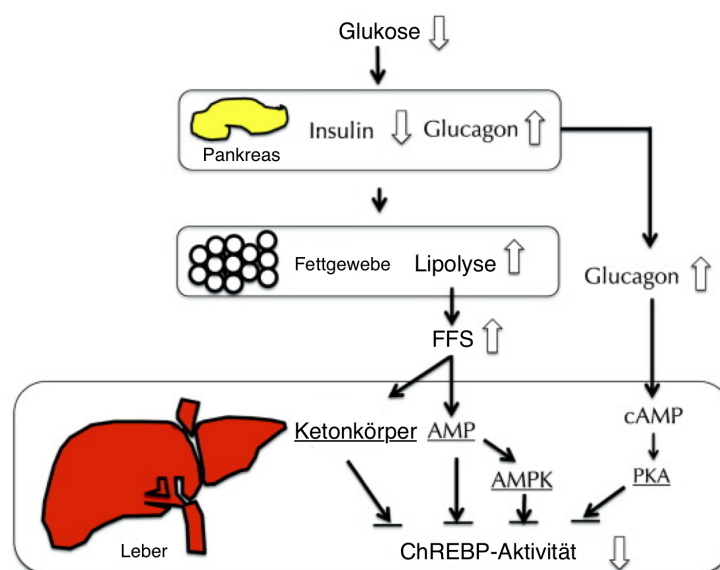


Abbildung 3.3: Inhibition von ChREBP bei Glukosemangel. Fehlt Glukose, so kommt es durch Wegfall der Insulinsekretion zu einer gesteigerten Lipolyse und Anstieg der freien Fettsäuren (FFS). Diese zeigen in der Leber einen Energiemangel an, sodass durch vermehrte Bildung von Ketonkörpern und AMP (über die AMPK) ChREBP in seiner Aktivität gehemmt wird. Zudem führt der erhöhte Glucagonspiegel zu einer cAMP-vermittelten Aktivierung der PKA, die ChREBP durch Phosphorylierung hemmt. AMP, Adenosinmonophosphat; AMPK, AMP-Kinase; PKA, Proteinkinase A, cAMP, zyklisches Adenosinmonophosphat. Entnommen (modifiziert) aus [44]



**Aktivierung durch Glukose-Metabolite** Bei einem Glukose bedingten Blutzuckeranstieg muss der Stoffwechsel dementsprechend umgestellt werden. Dazu wird u.a. ChREBP (Isoform-*alpha*) über sein intramolekulares GSM (s.o) aktiviert und die Expression für am Glukosestoffwechsel beteiligte Enzyme eingeleitet. Zudem erfolgt eine Dephosphorylierung der AS-Seitenketten von ChREBP, der dadurch aktiviert wird. Eine wichtige Rolle hierbei spielt vermutlich Xylulose-5-Phosphat (X5P) . Dabei handelt es sich um ein Zwischenprodukt des nicht oxidativen Teils des Pentosephosphatweges, einem von der Glykolyse abgehender alternativer zytosolischer Abbauweg der Glukose zur Lieferung von Reduktionäquivalenten (NADPH) sowie Ribosephosphaten zur Nukleotidsynthese [89]. Das XP5 aktiviert die Proteinphosphatase 2A (PP2A) , die wiederum Zielstrukturen der PKA (s.o) dephosphoryliert. Dadurch kommt es zur Translokation von ChREBP in den Zellkern und damit zur Aktivitätssteigerung [43]. Ein weiterer Aktivator von ChREBP stellt Glukose-6-Phosphat (G6P) dar. Es entsteht im Rahmen der Glykolyse (1.Schritt) unter Aufwendung von ATP aus Glukose. [87]. Es kann ChREBP aktivieren, indem es an GRACE (s.o) zu binden scheint und so die allosterische Regulierbarkeit von ChREBP verbessert [71, 1]. Die Glukose-6-Phosphatase (G6-Pase) ist ein wichtiges Enzym der Glukoneogenese und kommt in Leber und Niere - die Orte der Glukoneogenese - vor [32]. Es katalysiert die Rückbildung von G6P zu Glukose und ist somit essentiell an der Freisetzung von Glukose beteiligt [90]. Es reguliert so das Vorhandensein von G6P und damit die Aktivität von ChREBP [43, 44, 1]. Letzendlich wird ChREBP auch über Fruktose-2,6-Bisphosphat (F2,6BP) aktiviert. Es reguliert so die Genexpression von ChREBP, indem es dessen nukleäre Translokation und Aktivität steigert [7, 43, 1]. Die grundlegenden Abläufe bei der Aktivierung von ChREBP durch Metabolite des Glukosestoffwechsels sind in Abb. 3.4 dargestellt.

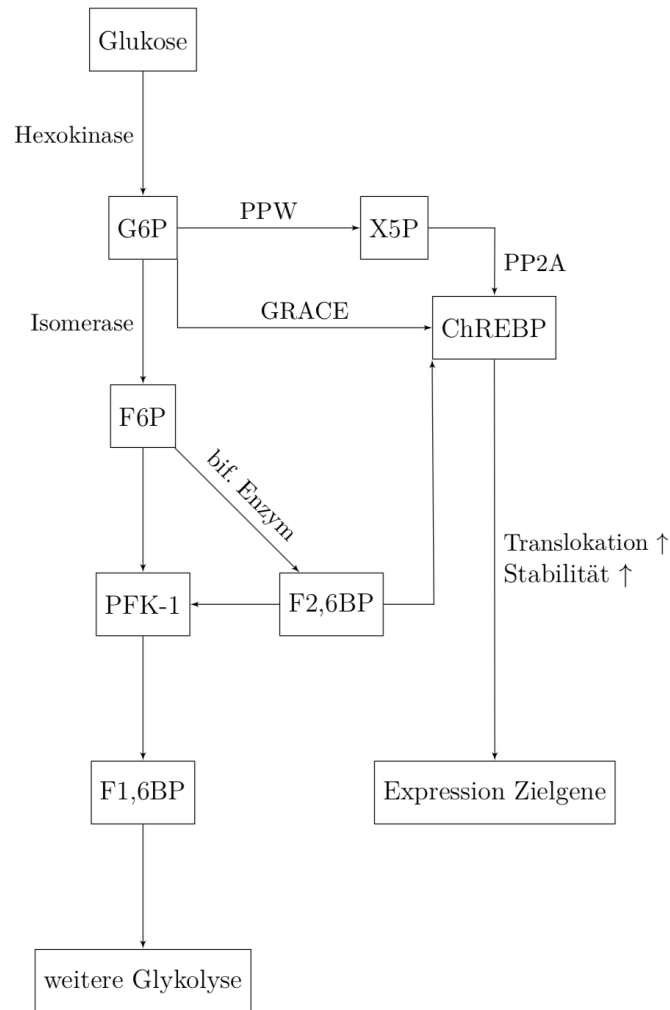


Abbildung 3.4: Aktivierung von ChREBP durch verschiedene Glukose-Metabolite im Rahmen der Glykolyse. Glukose wird nach Aufnahme in die Zelle zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. Dieses kann ChREBP direkt durch Bindung an dessen GRACE aktivieren. Über den Pentosephosphatweg (PPW) kann G6P zu Xylulose-5-Phosphat (X5P) umgebaut werden, das ChREBP über Aktivierung der Proteinphosphatase 2A (PP2A) positiv beeinflusst. Weiterhin kann G6P zu Fruktose-2,6-Bisphosphat (F2,6BP) metabolisiert werden und CHREBP in seiner Wirkung verstärken. F2,6BP ist zudem der stärkste allosterische Aktivator der Phosphofruktokinase-1 (PFK-1), dem Schlüsselenzym der Glykolyse. Aufgrund der gesteigerten Aktivität von ChREBP (u.a. über Beeinflussung der Stabilität und Translokation) kommt es zu einer vermehrten Expression der Zielgene. F6P, Fruktose-6-Phosphat; bif. Enzym, bifunktionales Enzym; F1,6BP, Fruktose-1,6-Bisphosphat.

### 3.2.5 Organspezifische Bedeutung von ChREBP

ChREBP wird in Organen, die eine de-novo-Lipogenese betreiben und/oder einen ausgeprägten Glukosestoffwechsel aufzeigen, exprimiert und kontrolliert physiologische Stoffwechselprozesse in den entsprechenden Geweben. Dies sind vor allem Leber, weißes und braunes Fettgewebe sowie die Drüsen der laktierenden Mammae. Darüber hinaus zeigen auch Pankreasinseln, Dünndarm und Skelettmuskulatur eine erhöhte Bildung von ChREBP. Im Gehirn und in den Nieren ist ChREBP ebenfalls zu finden [45, 43, 44, 1].

**Niere** Trotz ihrer Beteiligung an der Regulation des Blutzuckerspiegels ist die physiologische Bedeutung von ChREBP im Hinblick auf die Niere und ihren vielfältigen Funktionen kaum untersucht. Auch der Einfluss von ChREBP auf die Entstehung von Stoffwechsel-assoziierten pathologischer Veränderungen wie die diabetische Nephropathie (s.u.) ist zu großen Teilen noch ungeklärt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von ChREBP und dessen Zielgenen sowie dem Vorliegen einer diabetischen Nephropathie bei Mäusen besteht. In ChREBP-Knockout Mäusen wurde eine verringerte Expression proinflammatorischer Zytokine und Enzyme wie Interleukin-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und COX-2 (Zycklooxygenase- 2) nachgewiesen. Auch Marker wie phosphoryliertes IRE-1a und PERK, die einen ER-Stress und damit degenerative Veränderungen anzeigen, sind in ChREBP-Knockout Mäusen erniedrigt [127].

Ein histologisches Merkmal der diabetischen Nephropathie ist die massive Anreicherung von extrazellulärer Matrix in die Glomeruli. Vor allem funktionale Veränderungen der Mesangiumzellen infolge einer Hyperglykämie induzierten metabolischen sowie hämodynamischen Umstellung scheinen essentiell daran beteiligt zu sein [55]. Hohe Glukosekonzentrationen führen zu einer Überproduktion von extrazellulärer Matrix durch die Mesangiumzellen sowie zur Inhibition von extrazellulären Proteasen (z.B. durch PAI-1) [48]. An dieser Glukose-induzierten Reaktion scheint ChREBP beteiligt zu sein, indem er u.a. zu einer vermehrten Expression von Kollagen IV und Kollagen VI führt. Das Ausschalten von ChREBP führte zu einer Aufhebung dieser Glukose-induzierten Reaktion [55].

**Leber** Als das zentrale Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers spielt die Leber eine entscheidende Rolle bei der Anpassung des Fett- und Glukosestoffwechsel an unterschiedliche Stoffwechsellagen. Bei ausreichender Glukoseverfügbarkeit finden hier Glykolyse, Glykogenspeicherung sowie die Synthese von Fettsäuren und Triacylglyceriden (TAG) statt, während sie bei Nahrungsmangel durch Glukoneogenese, Glykogenabbau die Energieversorgung des Körpers aufrechterhält [88]. ChREBP besitzt als Schlüsselfigur im Fett- und Glukosestoffwechsel einen entscheidenden Einfluss auf die physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge in der Leber.

ChREBP ist essentiell an der Aktivierung der Lipogenese in den Hepatozyten beteiligt [43, 44]. Bei erhöhtem Glukoseangebot wird Insulin freigesetzt und die Lipogenese induziert. Ein wichtiger Mediator dabei ist das Sterol Response Element Binding Protein 1c (SREBP-1c), das die Expression von Enzymen der Fettsäure- und TAG-Synthese vermittelt [22, 45]. Eine wesentliche Voraussetzung für eine suffiziente Induktion der Transkription und optimale Aktivierung der Lipogenese scheint die synergetische Beteiligung von ChREBP zu sein. SREBP-1c aktiviert die Glukokinase der Hepatozyten, sodass vermehrt G6P und X5P gebildet werden, die ChREBP aktivieren, das wiederum Enzyme der Lipogenese wie die Acetyl-CoA-Carboxylase und FS-Synthase bildet. Tatsächlich führt das Fehlen von ChREBP bei Knockout-Mäusen zu einer reduzierten Expression von Glykolyse- bzw. Lipogenese-relevanter Gene und verminderten Synthese von TAG [45]. Durch eine RNAi-basierende Ausschaltung

von ChREBP in Hepatozyten kommt es zur Verringerung der Glukose-abhängigen Induktion von Glykolyse- und Lipogenese-assoziiierter Gene, einhergehend mit der Abnahme von zellulären Lipideinlagerungen [21].

Nach neueren Erkenntnissen scheint ChREBP die Cholesterin-Biosynthese zu regulieren, indem er die Proteinstabilität von SREBP-2, das als TF die Expression beteiligter Enzyme sowie des LDL-Rezeptors reguliert, moduliert [125]. Vermutlich ist ChREBP auch an der Pathogenese von hepatischen Glykogenosen beteiligt. Unter anderem liegt bei der Glykogenose Typ I (Gierke) ein Defekt der G6-Pase vor, sodass Glukose nicht mehr aus der Leber transportiert werden kann und eine starke Akkumulation von Glykogen innerhalb der Hepatozyten resultiert [90]. ChREBP aktiviert direkt die Expression der hepatischen G6-Pase-Gene und beeinflusst so die Glykogenspeicherung, sodass es in ChREBP-Knockout Mäusen über eine verringerte G6-Pase Expression zu einer Glykogenose mit einhergehender Hepatomegalie gekommen ist [44].

**Fettgewebe** Der Transkriptionsfaktor ChREBP hat Einfluss auf die Lipogenese innerhalb des Fettgewebes. Eine erhöhte Expression von ChREBP geht mit einer gesteigerten Synthese des Glukosetransporters GLUT4 und erhöhten Bildung von Enzymen der Lipogenese einher. Bei niedriger Expression von ChREBP und GLUT4 kommt es zu einer Insulinresistenz und Hyperglykämie [35, 43]. Eine Überexpression von ChREBP- $\beta$  im weißem Fettgewebe von diätischen Mäusen führt zu einer verbesserten Insulinsensitivität und abnehmenden Verfettung der Leber sowie Reduktion der Fettmassen, vermutlich durch einen positiven Einfluss von adipozytärem ChREBP auf die Glukose-Homöostase [83]. ChREBP ist zudem an der adipozytären Differenzierung beteiligt. Unter anderem konnte eine erhöhte ChREBP-Expression während der Reifung von menschlichen omentalen und subkutanen Vorläuferzellen zu Adipozyten beobachtet werden [41].

**Pankreas** Im Pankreas spielt ChREBP eine Bedeutung bei der Glukose-induzierten Proliferation von  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreasgewebes, unter anderem durch die Regulierung von Mediatoren des Zellzyklus wie Zyklin C, D2 und E. Dabei scheint wohl vor allem ChREBP- $\beta$  beteiligt zu sein [43, 44]. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Inhibition von ChREBP zu einer verschlechterten Glukose-induzierten  $\beta$ -Zellproliferation unter Abnahme der Regulatoren des Zellzyklus führt [74]. Außerdem scheint ChREBP- $\beta$  die Insulinproduktion und -sekretion zu verschlechtern und einen erhöhten oxidativen Stress auf die pankreatischen  $\beta$ -Zellen auszulösen [44].

### 3.2.6 Einfluss von ChREBP auf die Tumorgenese

Viele Arten von Tumoren zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Zellen einen stärkeren Zellsatz mit einhergehenden erhöhten Proliferationsraten haben. Zudem zeigen viele Tumorzellen eine erhöhte de-novo-Lipogenese sowie Nukleotidbiosynthese [111, 1]. Um den dadurch gesteigerten Energiebedarf decken zu können, ist eine Anpassung des Energiestoffwechsels notwen-

dig. Dazu erhöhen Tumorzellen ihre Glukoseaufnahme und beziehen ihre Energie aus einer gesteigerten nicht-oxidativen Glykolyse und damit verbundenen vermehrten Laktatbildung, trotz ausreichendem Sauerstoffangebot (sog. Warburg-Effekt) [66, 44]. An dieser Anpassung des Stoffwechsels scheint ChREBP beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass eine Unterdrückung von ChREBP in kolorektalen Tumorzellen (HCT116) und in hepatozellulären Tumorzellen (HepG2) zu einer Verringerung von Glykolyse und anabolen Stoffwechselwegen mit gleichzeitiger Umstellung des Stoffwechsels auf oxidative Phosphorylierung im Rahmen der mitochondrialen Zellatmung *in vivo*. Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der Proliferationsaktivität und Tumorstadium, unter anderem durch Induktion des Tumorsuppressors p53 und dessen Zielgenen [111].

Am Institut für Pathologie der Universität Greifswald -im Rahmen unserer Arbeitsgruppe- wurde gezeigt, dass eine Umschaltung des Leberstoffwechsels im Rahmen des Pankreasinseltransplantationsmodells auch für das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) charakteristisch ist. Dabei kommt u.a. der *de-novo*-Lipogenese sowohl aus pathogener als auch aus prognostischer Sicht eine entscheidende Bedeutung zu. Mit zunehmenden Differenzierungsverlust vom normalen Lebergewebe bis hin zum HCC nimmt das Ausmaß der aberranten Lipogenese zu, einhergehend mit zunehmender Aggressivität, Aktivierung des AKT-mTOR-Signalweges sowie Inhibition der AMPK. An der Transkription der für die Lipogenese notwendigen Enzyme sind u.a. SREBP-1 und -2, aber auch ChREBP beteiligt. Beispielsweise konnten im umliegenden, nicht-tumorösen Lebergewebe erhöhte mRNA- sowie Protein-Spiegel von ChREBP und SREBP-1/-2 nachgewiesen werden, einhergehend mit einer verstärkten Expression lipogener Enzyme. In Geweben des HCC war ein zusätzlicher Anstieg zu beobachten [12, 91, 94]. Anhand von ChREBP-Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten von ChREBP zu einer deutlichen Verschlechterung bzw. Verspätung der AKT oder AKT/c-Met vermittelten Hepatocarcinogenese führt. Darüber hinaus nahm durch Unterdrückung von ChREBP mittels siRNAs die Proliferation muriner und menschlicher HCC-Zelllinien bei gleichzeitig gesteigerter Apoptose ab. Dieser Effekt konnte durch gleichzeitige Inhibition des Mitogen-activated-Proteinkinase (MAPK) -Signalwegs noch deutlich verstärkt werden. Allerdings führte das Ausschalten von ChREBP in Mäusen bei Koexpression von AKT und NRAS-Protoonkogenen zu keiner Veränderung der HCC-Entwicklung. Daher ist anzunehmen, dass ChREBP je nach beteiligten Protoonkogenen zum Teil wesentlich zur Entwicklung eines HCC beiträgt [92].

In Gewebe-Mikroarrays von menschlichen Mammakarzinomen wurde eine erhöhte Expression von ChREBP nachgewiesen, die gleichzeitig mit der Tumorprogression positiv korreliert. Im Rahmen weiterer Analysen konnte allerdings kein Zusammenhang zwischen erhöhten ChREBP-Werten und dem klinischen Outcome gefunden werden [5]. In humanen, Androgen-resistenten Prostata-Carcinomen ist ebenfalls eine Überexpression von ChREBP zu beobachten. Hier scheint ChREBP und die Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs die Proliferation der Tumorzellen zu steigern [52]. ChREBP scheint aber auch tumorsuppressive Eigenschaften zu besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von ChREBP in

leukämischen Mäusen die Differenzierung von Leukämie inziierenden Zellen blockiert und mit einer deutlichen Reduktion der Überlebensrate einhergeht. In menschlichen Leukämie-Zellen (THP1) resultierte das Ausschalten von ChREBP ebenfalls in einer gesteigerten Zellproliferation bei abnehmender Differenzierung [124]. Eine konkrete Beteiligung von ChREBP auf die renale Tumorgenese konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden.

### 3.3 Intraportales Pankreasinseltransplantationsmodell

Bei dem intraportalem Inseltransplantationsmodell (IPITM) handelt es sich um ein anerkanntes Tiermodell, das im Wesentlichen dazu dient, von Mäusen oder Ratten isolierte Pankreasinseln in die Leber eines Empfängertieres mittels intraportaler Injektion zu transplantieren, um so nach deren Anwachsen eine lokale Hyperinsulinämie innerhalb des Leberstromgebietes zu erzeugen (für Ablauf siehe 4.2). In Kombination mit einem Streptocotocin-induzierten Diabetes und der daraus resultierenden Hyperglykämie wird in der Leber ein Diabetes mellitus Typ II simuliert. Dementsprechend kann es zur Untersuchung der Insulinvermittelten Hepatocarcinogenese- wie im Rahmen des Diabetes Typ II- unter Entstehung klarzelliger Foci (CCF, engl. für: clear cell foci), die aus veränderten Hepatozyten bestehen, genutzt werden. Diese CCF sind durch eine massive Glykogenspeicherung (Glykogenose) sowie Aktivierung des protoonkogenen AKT/mTOR-Signalwegs gekennzeichnet und gelten als präneoplastische Läsionen des HCC [24, 12, 91, 94]. Dieses Modell wurde zunächst von Prof. Dr. med. F. Dombrowski, dem Leiter des pathologischen Instituts der Universität Greifswald, an diabetischen Ratten durchgeführt. Durch die intraportale Inseltransplantation kam es bei Ratten mit einem Streptozotocin-induzierten Diabetes im Abflussgebiet zu einer Hyperproliferation und gesteigerter Apoptose der Hepatozyten innerhalb der Leberazini [24, 25].

Unsere Arbeitsgruppe hat das IPITM auf diabetische Mäuse übertragen, ergänzt durch das Ausschalten des TF ChREBP, um dessen Rolle als potentieller Mediator bei der Entwicklung der CCF und von hepatischen Tumoren untersuchen zu können. Bei Kurzzeitversuchen (Versuchsdauer: 1 Woche und 4 Wochen) konnte gezeigt werden, dass die CCF von ChREBP-Knockout-Mäusen eine vermehrte Glykogenakkumulation bei gleichzeitiger Reduktion der G6-Pase-Aktivität sowie einer verringerten Glykolyse und Lipogenese zeigen. Es wurden verringerte Mengen von Stoffen, die am AKT/mTOR-Signalweg beteiligt sind, nachgewiesen. Die Proliferationsaktivität der CCF von CHREBP-Knockout-Mäusen war im Vergleich zu den C57/BL-WT-Mäusen erniedrigt. Demnach scheint ChREBP eine wichtige Rolle bei der AKT/mTOR-vermittelten Zellproliferation zu spielen und essentiell an der Umstellung des hepatozytären Stoffwechsels von einem glykogenotischen zu einem lipogenem Phänotyp innerhalb der CCF als Vorläuferläsionen des HCC beteiligt zu sein [91, 94, 92].

### 3.4 Diabetes mellitus

Beim Diabetes mellitus (DM) handelt es sich um eine Gruppe metabolischer Erkrankungen, die mit einem erhöhten Blutgukosespiegel einhergehen. Die Diagnose erfolgt u.a. anhand

der Blutglukosekonzentration ab einem Nüchternplasmaglukose-Wert  $\geq 126$  mg/dl bzw.  $\geq 7,0$  mmol/l. Ein weiteres Kriterium ist der Anteil am glykolisierten Hämoglobin ( $HbA_{1c}$ , bei  $DM > 6,5\%$ ) im Blut [11, 105]. Es werden zahlreiche Formen unterschieden, die durch ein komplexes Zusammenspiel von genetischer Disposition und Umweltfaktoren entstehen. Im Hinblick auf die zugrundeliegende Ätiologie können eine gestörte Insulinproduktion bzw. -sekretion, ein fehlerhafter Glukosestoffwechsel sowie eine gesteigerte Produktion von Glukose eine Grundlage für die Hyperglykämie darstellen [105, 103, 79].

### 3.4.1 Einteilung

Die Klassifikation des DM erfolgt anhand der zur Hyperglykämie führenden Ätiologie und damit verbundenen pathologischen Prozessen. Die zwei Hauptformen des DM bilden der Typ 1 und Typ 2.

**Diabetes Typ 1** Beim DM Typ 1 (5-10% der Fälle) kommt es infolge einer Autoimmunreaktion zu einer zunehmenden  $\beta$ -Zellzerstörung des Pankreas. Daraus entsteht ein absoluter Insulinmangel, der zur Hyperglykämie führt. Der DM Typ 1 ist die häufigste Form im Kindesalter und tritt meistens bei Patienten unter 25 Jahren auf. [80] Ursächlich für die  $\beta$ -Zellzerstörung ist meistens eine Autoimmunreaktion infolge einer Autoantikörperbildung (Inselzellantikörper, ICA) mit Infiltration von Lymphozyten in den Pankreasinseln (Insulinitis) und assoziierten Lymphknoten. Die Zellzerstörung scheint vor allem durch CD8-positive T-Zellen zu erfolgen. Die genauen Mechanismen sind bislang allerdings noch nicht bekannt [105, 103, 36] Der Diabetes wird erst symptomatisch, wenn ein Großteil der  $\beta$ -Zellen (70-80%) zerstört wurde und der existierende Restbestand an Insulin produzierenden Zellen die Glukosetoleranz nicht mehr aufrechterhalten kann. Der Übergang zwischen einer gestörten Glukosetoleranz zu einem manifesten Diabetes wird meistens durch Stressfaktoren wie Infektionen und Operationen begünstigt, die mit einem vermehrten Insulinbedarf verbunden sind ([105, 103, 80]). In manchen Fällen werden sogar keine Anzeichen eines autoimmunologischen Prozesses gefunden, bei denen ein bislang noch unbekannter Mechanismus zur Entwicklung des DM Typ 1 führt (idiopathischer Subtyp) [79].

**Diabetes Typ 2** Der Diabetes mellitus Typ 2 umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, die zu einer Hyperglykämie führen und sich durch eine gestörte Insulinsekretion, Insulinresistenz, einer massiven hepatischen und renalen Glukoneogenese sowie einem gestörten Muskel- und Fettstoffwechsel auszeichnen. Meistens manifestiert er sich erst im höheren Lebensalter, tritt aber auch zunehmend bei jungen Erwachsenen auf, insbesondere im Rahmen von Übergewicht und Bewegungsmangel [103, 79]. Zu Beginn der Erkrankung ist die Glukosetoleranz trotz der bestehenden Insulinresistenz fast normal, bedingt durch eine kompensatorische Mehrproduktion seitens der pankreatischen  $\beta$ -Zellen. Mit Fortschreiten der Erkrankung können die  $\beta$ -Zellen die Hyperinsulinämie nicht aufrechterhalten, sodass mit

zunehmender Dekompensation eine gestörte Glukosetoleranz entsteht. Nimmt die Insulinsekretion weiter ab, so entwickelt sich einhergehend mit einer gesteigerten Glukoneogenese ein manifester Diabetes mellitus mit pathologischer Nüchternglukose. Der relative Insulinmangel kann bei vollständiger Erschöpfung der  $\beta$ -Zellen in einen absoluten Insulinmangel übergehen [103, 79]. Treten eine Insulinresistenz, Dyslipidämie, arterielle Hypertonie und Fettverteilungsstörung (stammbetonte Adipositas) auf, so liegt ein metabolisches Syndrom vor [79].

### 3.4.2 Pathobiochemie

Infolge des Insulinmangels bzw. der erhöhten Insulinresistenz kommt es zu unterschiedlichen metabolischen Veränderungen in den jeweiligen Geweben. Im Fettgewebe als Insulin abhängiges Gewebe ist die Glukoseaufnahme beeinträchtigt. Gleichzeitig ist die Lipolyse und damit die Freisetzung von Fettsäuren aus den Adipozyten erhöht. In der Muskulatur werden durch den Glukosemangel Proteine zur Energiegewinnung abgebaut und damit Aminosäuren freigesetzt. Die so gebildeten freien Fett- und Aminosäuren sowie das Glycerin gelangen zur Leber und Niere [57, 109]. Dies führt zum einen zu einer gesteigerten Lipidsynthese unter Bildung von TAG und VLDL in den Hepatozyten. Auf Grundlage dieser Hyperlipidämie und der damit einhergehenden massiven Fettleinlagerung und Lipotoxizität in die Hepatozyten kann sich eine NASH bilden und zu pathologisch erhöhten Leberenzymen führen [30]. Gleichzeitig entsteht so die für den DM Typ 2 charakteristische Dyslipidämie mit erhöhten TAG- und verringerten HDL-Werten [79]. Zum anderen bildet die Leber aus den anfallenden Fettsäuren vermehrt Acetyl-CoA, das wiederum von den Hepatozyten zur Ketonkörpersynthese verwendet wird. Damit kommt es zu einem gesteigerten Anfall von Ketonkörpern (Aceton, Acetoacetat und  $\beta$ -Hydroxybuttersäure) bis hin zu einer Ketoazidose, vor allem bei DM Typ 1. Das Glycerin hingegen wird von den Leberzellen über die Glukoneogenese zu Glukose umgewandelt, die dann ins Blut abgegeben wird und so zu einem erhöhten Blutglukosespiegel führt. Gleichzeitig ist der Glykogenabbau gesteigert, was ebenfalls zur Entwicklung der Hyperglykämie beiträgt [57]. In der Niere kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Glukoneogenese, bei der insbesondere aus anfallendem Laktat und Glutamin neue Glukose synthetisiert und freigesetzt wird [76, 108, 32, 109]. Auch die Rückresorption der filtrierten Glukose wird durch vermehrte Expression der SGLT stark gesteigert und trägt so zur Hyperglykämie bei [97]. Ergänzend sind die wichtigsten pathobiochemischen Mechanismen in Abb. A.1 im Anhang dargestellt.

### 3.4.3 Pathologische Veränderungen der Niere

**Diabetische Glomerulopathie** Vor allem die glomerulären Kapillarschlingen sind von der diabetischen Mikroangiopathie betroffen. Die Glomerulosklerose tritt bei den meisten Typ-1- und Typ-2- Diabetikern nach einer Erkrankungsdauer von mehr als 10 Jahren auf. Initial kommt es durch die irreversible Anlagerung von sog. advanced glycosylation endpro-



ducts (AGE) zu einer Glykolisierung der Matrixproteine und Verbreiterung der glomerulären Basalmembran. Daraus resultiert initial eine Hyperfiltration mit Vergrößerung der Nieren. Infolge der zunehmenden Glykolisierung verzögert sich der Umsatz betroffener Matrixproteine, sodass diese immer stärker akkumulieren. Folglich kommt es zu einer Sklerosierung und Verödung der betroffenen Glomeruli. Auch die zugehörigen Tubuli atrophieren und vernarben zunehmend. Makroskopisch resultiert durch die multiplen Vernarbungen eine zunehmende feine Granulierung der Nierenoberfläche bis hin zu einer Schrumpfniere im Endstadium [78, 56]. Histologisch imponiert eine diffuse Glomerulosklerose, verursacht durch die Basalmembranverdickung und entsprechender Akkumulation von Basalmembranmaterialien innerhalb der mesangialen Matrix. Zudem führt die Mikroangiopathie zu einer nodulären Glomerulosklerose (sog. Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson), bei der sich eosinophile Knötchen in den glomerulären Kapillaren nachweisen lassen, die aus extrazellulären Matrixbestandteilen bestehen. Diese diabetesspezifische Läsion ist bei ca. 30% der Diabetiker in Assoziation mit der diffusen Form zu finden. Begleitend besteht eine ausgeprägte Arthero- bzw. Arteriosklerose der Nierengefäße [78, 56].

**Tubuläre Speicherung von Glykogen** Auch das renale Tubulussystem ist im Rahmen des DM und die damit einhergehenden metabolischen Veränderungen pathologisch verändert. Im Allgemeinen kann es zu einer Anreicherung verschiedener Substanzen kommen. Unter anderem können sich beim nephrotischen Syndrom Eiweiße und Fette in den Tubulusepithelien einlagern [78]. Darüber hinaus kann es zu einer starken Glykogenspeicherung innerhalb der Tubuli (siehe 3.5) kommen [37, 51, 113, 95, 109].

## 3.5 Glykogenspeicherung

### 3.5.1 Synthese von Glykogen

Die aufgenommene Glukose, die nicht direkt für den Stoffwechsel benötigt wird, wird in Form von Glykogen gespeichert. Dabei handelt es sich um ein aus Glukose gebildetes Polysachharid, das in fast allen Körperzellen gebildet wird. Unter physiologischen Bedingungen wird es in größeren Mengen vor allem im Muskel und in der Leber intrazellulär gespeichert. Um Glukose in Form des Glykogens einlagern zu können, sind verschiedene Schritte nötig. Zunächst wird Glukose zu G6P phosphoryliert (Enzym: Glukokinase/Hexokinase), anschließend zu Glukose-1-Phosphat (G1P) isomerisiert (Enzym: Phosphoglucomutase) und zur energiereichen Verbindung UDP-Glukose aktiviert. Letztere dient schließlich als Ausgangsstoff des Einbaus von Glukose in ein vorhandenes Glykogenmolekül. Dabei wird unter Abspaltung des UDP die Glukose durch Bildung einer  $\alpha$ -(1→6)-glykosidischen Bindung an das Glykogen gebunden, das dadurch verlängert wird (Enzym: Glykogen-Synthase). Die typische Verzweigung des Glykogens wird durch das sog. branching enzyme katalysiert, das eine bestehende  $\alpha$ -(1→4)-glykosidische Bindung zwischen zwei Glukosemonomeren löst, um das dabei frei werdende Oligosachharid über eine  $\alpha$ -(1→6)-glykosidische Bindung wieder an das Glyko-

gen zu binden. Dadurch entsteht ein großes, stark verzweigtes Molekül, das aufgrund seiner vielen Enden je nach Stoffwechsellage rasch auf- und abgebaut werden kann [90, 40, 109]. Die Neubildung eines Glykogens, das als Ausgangspunkt einer solchen Verlängerung dienen kann, erfolgt durch Glykogenin. Dieses bildet Dimere, die sich gegenseitig glykolisieren. Als Substrat fungiert ebenfalls UDP-Glukose. Dadurch entsteht ein acht Glukoseeinheiten langes und mit dem Glykogenin verbundenes Oligosaccharid, das der Glykogen-Synthase als Primer dient [90, 109, 40].

### 3.5.2 Formen

Je nach Ausmaß der Glykogensynthese lagert sich das Glykogen mitsamt der für den An- und Abbau notwendigen Enzymen intrazellulär in Aggregaten an, die elektronenmikroskopisch sichtbar sind. Dabei werden  $\alpha$ - und  $\beta$ - Partikel unterschieden. Die  $\beta$ - Partikel bestehen aus bis zu 50.000 Glukoseeinheiten, die zusammen mit der Glykogen-Synthase und dem Branching-Enzym circa 10-30nm (Diameter) große, rundliche Aggregate im Zytoplasma bilden. Diese Art der Partikel ist insbesondere in Zellen von quergestreifter Muskulatur nachweisbar und zeichnet sich durch eine rasche Freisetzbarkeit der gespeicherten Glukose aus [121, 65, 109]. Lagern sich mehrere (10-15) solcher  $\beta$ -Partikel zusammen, so bilden sich größere und komplexere Aggregate, die als  $\alpha$ -Partikel bezeichnet werden. Sie zeigen typischerweise einen rosettenartigen Aufbau und sind im Durchschnitt 150-200nm (Diameter) groß. Diese Form findet sich vor allem in Hepatozyten und Herzmuskelzellen und zeichnet sich durch einen langsameren Abbau aus, der eine stabilere und länger anhaltende Freisetzung von Glukose ermöglicht [90, 109, 121]. Siehe hierzu Abb. 3.5.

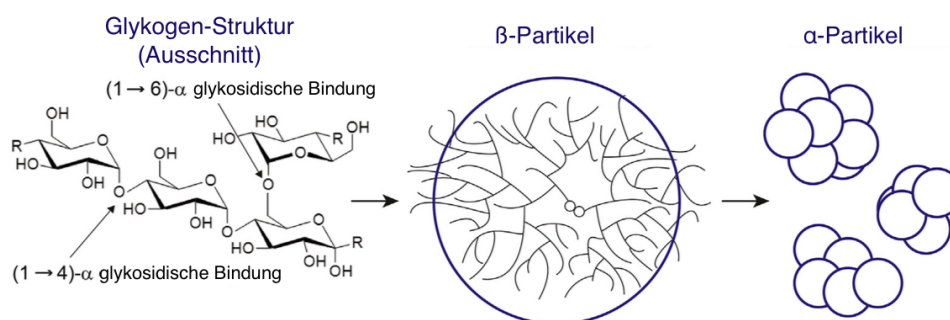


Abbildung 3.5: Struktur und unterschiedliche Akkumulationsformen von Glykogen. Die Glukosemonomere sind innerhalb des Glykogens durch eine  $\alpha$ -(1→6)- und  $\alpha$ -(1→4)-glykosidische Bindung miteinander verbunden. Glykogen, bestehend aus tausenden solcher Glukoseeinheiten, bildet mit den Enzymen des Glykogenaufbaus sog.  $\beta$ -Partikel. Lagern sich mehrere  $\beta$ -Partikel zusammen, so entstehen große Glykogenaggregate in Form von  $\alpha$ -Partikeln. Entnommen (modifiziert) aus [109]

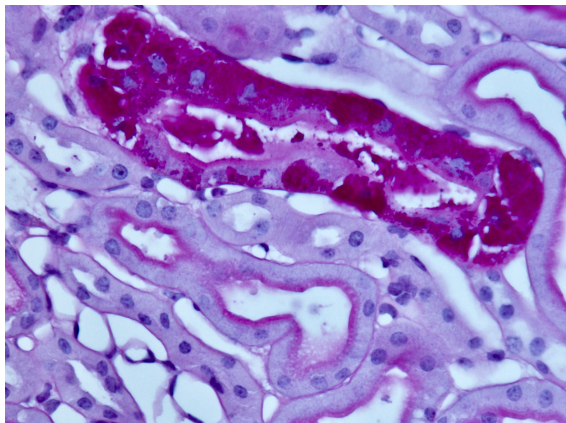
### 3.5.3 Vorkommen in der Niere und anderen Geweben

**Niere** In der Niere lässt sich normalerweise kaum Glykogen nachweisen. Besteht allerdings ein Diabetes so kommt es zu einer massiven Einlagerung von Glykogen. Diese zeigt sich

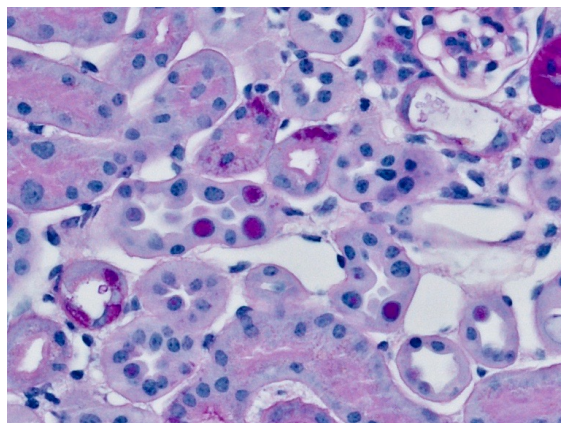
sowohl bei DM Typ 1 als auch bei einem DM Typ2 und ist in den Zellen des Tubulusepithels nachweisbar. Bei den betroffenen Tubulusepithelien handelt es sich sog. Armanni-Ebstein-Läsionen (AEL), die sich durch eine Mehrspeicherung intrazytoplasmatischem PAS-positivem Glykogen auszeichnen. Diese AEL, erstmalig von Luciano Armanni im Jahr 1872 beschrieben, werden vermehrt im distalen Tubulusepithel und dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife beobachtet, kommen aber auch im proximalen Tubulusepithel vor. Außerdem scheinen nicht nur die Schwere der Hyperglykämie, sondern auch die zeitliche Dauer eine wichtige Rolle bei Bildung der AEL zu spielen. Deren genaue Bildung und Zusammensetzung ist noch nicht geklärt [37, 51, 113, 95, 109]. Begleitend tritt im Rahmen des Diabetes eine vermehrte Aufnahme von Glukose über eine erhöhte Aktivität der SGLT in die Tubuluszellen auf. Dabei zeigt vor allem das proximale Tubulusepithel über eine verstärkte Expression des SGLT-2 eine Steigerung seiner Glukoseaufnahme [109, 32]. Darüber hinaus ist die renale Glukoneogenese, hauptsächlich in den proximalen Tubuluszellen, bei fehlender oder unzureichender Insulinaktivität massiv gesteigert [76, 97, 109].

Es ist unklar, welche Bedeutung den Glykogeneinlagerungen im Nierenparenchym zukommt. Es wird diskutiert, ob es sich dabei um eine Art metabolische oder protektive Anpassungsreaktion infolge des DM handelt, um die Nierenfunktion aufrechtzuerhalten. U.a. steigt im Rahmen des DM der Sauerstoffverbrauch an und mündet in eine chronische Hypoxie des Nierenparenchyms, begleitet von einer mitochondrialen Schädigung, sodass eine Umstellung der oxidativen Energiegewinnung ( $\beta$ -Oxidation, oxidative Phosphorylierung) auf einen Sauerstoff sparenderen Stoffwechsel (Glykolyse) erfolgt und damit die Glykogenakkumulation aus einem gestörten Metabolismus resultiert [28, 109, 17]. Es könnte sich bei den AEL auch um pathologische Veränderungen infolge von aberranten Enzymaktivitäten oder -defekten und einen daraus resultierenden gestörten An- und Abbau handeln [109]. In diesem Sinne konnte anhand von Ratten gezeigt werden, dass eine Diabetes bedingte Einlagerung von Glykogen mit einer erhöhten Aktivität der Glykogen-Synthase und einer gesteigerten Expression von Glykogenin bei gleichzeitiger Hemmung der Glykogen-Phosphorylase, dem Abbau-Enzym des Glykogens, einhergeht [59]. Damit könnten die AEL unlösliche Glykogenaggregate darstellen, die solchen bei Glykogenspeicherkrankheiten ähneln und selbst eine schädigende Wirkung entfalten und zur diabetischen Nephropathie beitragen [109].

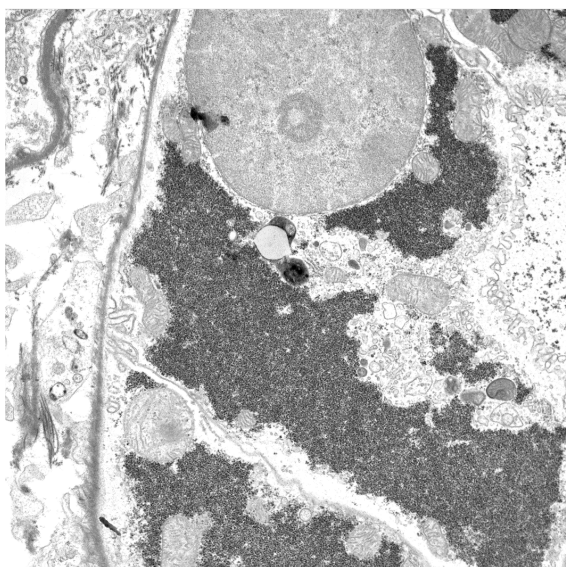
In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits in Kurzzeitexperimenten von bis zu vier Wochen (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe) gezeigt werden, dass es auch bei diabetischen Mäusen vermehrt zur Glykogenakkumulation in den Tubulusepithelien kommt. Dabei handelt es sich entweder um eine intrazytoplasmatische Glykogenanreicherung im Sinne von Armanni-Ebstein-Läsionen oder um nukleäre Einlagerungen in Form von Glykogenspeicherkernen. Diese lassen sich sowohl mithilfe der PAS-Reaktion als auch elektronenmikroskopisch nachweisen (siehe Abb. 3.6).



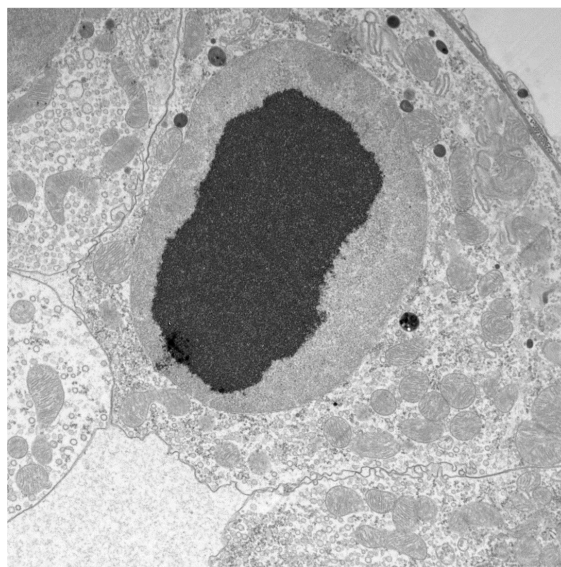
(a) AEL (proximaler Tubulus). Färbung: PAS. Länge untere BK: 0,25 mm



(b) GSK (distaler Tubulus). Färbung: PAS. Länge untere BK: 0,25 mm



(c) AEL (proximaler Tubulus). Elektronenmikroskopische Aufnahme



(d) GSK (distaler Tubulus). Elektronenmikroskopische Aufnahme.

Abbildung 3.6: PAS-Reaktionen und elektronenmikroskopische Aufnahmen von Armani-Ebstein-Läsionen und Glykogenspeicherkernen. Sowohl die intrazytoplasmatisch lokalisierten AEL (a, rot) als auch das im Zellkern angereicherte Glykogen (b, rot) lassen sich mittels der PAS-Reaktion nachweisen. Es konnte mithilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass es sich bei den eingelagerten, PAS positiven Strukturen tatsächlich um Glykogen (schwarz) handelt (AEL=c; GSK=d). AEL, Armani-Ebstein-Läsionen; GSK, Glykogenspeicherkerne.

**Leber, Muskel, Herz und FG** Im Allgemeinen können Glykogenpartikel in nahezu jedem Gewebe vorkommen. In größeren Mengen kommt Glykogen unter physiologischen Bedingungen vor allem in der Leber, Skelettmuskulatur und im Herzen vor. Während Kardiomyozyten und quergestreifte Muskelzellen das Glykogen für ihren eigenen Energiebedarf verwenden, so nutzt die Leber ihre Glykogendepots zur Regulation und Aufrechterhaltung des systemischen Blutzuckers und damit zur Versorgung anderer Gewebe. Innerhalb des Fettgewebes kommt Glykogen nur in sehr geringen Maße vor. Je nach Stoffwechselsituation oder Vorliegen eines DM verändert sich das Ausmaß der Glykogenspeicherung und deren Struktur [65, 109].

## 4 Material und Methode

### 4.1 Versuchsrahmenbedingungen

Im Folgenden wird beschrieben, welche Versuchsgruppen im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden und unter welchen Bedingungen diese bis zum jeweiligen Versuchsende gehalten werden.

#### 4.1.1 verwendete Tierstämme

Bei dieser Arbeit wurde der Stamm B6.129S6-Mlxipl<sup>tm1Kuy</sup>/J (=ChREBP-Knockout) sowie der zugrundeliegende Wildtyp-Stamm C57Bl6/J (=Wildtyp) als Kontrolle verwendet. Bei ersterem liegt eine durch homologe Rekombination und damit verbundenen Austausch der Expressionskassette erzielte Mutation des MLX interacting protein-like gene vor. Durch den daraus resultierenden Ausfall des ChREBP-Gens weisen die genetisch veränderten Tiere phänotypisch u.a. höhere Blutzucker- und Insulinspiegel sowie niedrigere Konzentrationen an freien Fettsäuren auf. Darüber hinaus verfügen die betroffenen Tiere über eine reduzierte hepatische Glykolyse und Lipogenese. Zudem neigen die ChREBP-Knockout-Mäuse zur Entstehung einer Insulinresistenz und Lebervergrößerung [45, 46]. Ursprünglich stammen die ersten ChREBP-Knockout-Tiere von der Firma Jackson Mice, während der Wildtyp von Charles River bezogen wurde, die Versuchstiere stammten aus einer anschließenden eigenen Weiterzucht.

#### 4.1.2 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in 16 Versuchsgruppen eingeteilt. Diese ergeben sich aus den Parametern Wildtyp oder ChREBP-Knockout, nicht diabetisch oder diabetisch, nicht transplantiert oder transplantiert sowie 3-monatiger oder 6-monatiger Versuchsdauer. Die jeweiligen Gruppenstärken sind in Tab. 4.1 bzw. 4.2 angegeben. Die größere Tierzahl in der transplantierten *und* diabetischen Wildtyp-Gruppe ist auf die Ergebnisse der Vorversuche zurückzuführen, da in dieser weniger CCF (siehe 3.3) entstanden waren, sodass hier eine Erhöhung der Gruppenstärke nötig war.

Stamm	Gruppe	Versuchs- dauer(in M.)	Tierzahl
Wildtyp	nicht diab./ nicht Tx	3	10
Wildtyp	diab./ nicht Tx	3	10
Wildtyp	nicht diab./ Tx	3	10
Wildtyp	diab./ Tx	3	19
Wildtyp	nicht diab./ nicht Tx	6	10
Wildtyp	diab./ nicht Tx	6	6
Wildtyp	nicht diab./ Tx	6	10
Wildtyp	diab./ Tx	6	20
Gesamt	—	—	95

Tabelle 4.1: Versuchsgruppen des Wildtyp-Stammes. diab., diabetisch; Tx, transplantiert; M., Monate.

Stamm	Gruppe	Versuchs- dauer(in M.)	Tierzahl
ChREBP-KO	nicht diab./ nicht Tx	3	10
ChREBP-KO	diab./ nicht Tx	3	10
ChREBP-KO	nicht diab./ Tx	3	8
ChREBP-KO	diab./ Tx	3	9
ChREBP-KO	nicht diab./ nicht Tx	6	9
ChREBP-KO	diab./ nicht Tx	6	9
ChREBP-KO	nicht diab./ Tx	6	10
ChREBP-KO	diab./ Tx	6	9
Gesamt	—	—	73

Tabelle 4.2: Versuchsgruppen des ChREBP-Knockout-Stammes. KO, Knockout; diab., diabetisch; Tx, transplantiert; M., Monate.

#### 4.1.3 Streptozotocin-induzierter Insulinmangeldiabetes

Um einen Insulinmangeldiabetes zu erreichen, wurde den Tieren Streptozotocin ( $0,18 \frac{\text{mg}}{\text{gKG}}$ , SIGMA Life Science ALDRICH, St.Louis/USA) zur Reduktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen und damit der endogenen Insulinproduktion im Alter von 8 Wochen injiziert. Nach der Streptozotocin-Gabe wurde der Blutzucker (BZ) nach einer Woche kontrolliert. Ein Tier galt als diabetisch, wenn der BZ-Wert  $\geq 16,8 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$  betrug.

#### 4.1.4 Tierhaltung

Die Tiere wurden während des Versuchs unter standardisierten Bedingungen in einer offenen Haltung mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus sowie einer Wasser- bzw. Futterzufuhr ad libitum in Kleingruppen von bis zu 5 Tieren gehalten. Die Luftfeuchte betrug 50-60%, während die Temperatur zwischen 22 und 24°C lag. Die verwendeten Materialien wie Käfige, Einstreu und Futter sind im Anhang (G) zu entnehmen.

Während des gesamten Versuchs wurde täglich der Gesundheitszustand der Tiere geprüft. Dazu wurde dessen Erscheinungsbild/Fellpflege bewertet, das spontane sowie provozierbare Verhalten beobachtet, die Atmung untersucht, ein stattgefundener Gewichtsverlust dokumentiert und eine Inspektion der Mundhöhle vorgenommen. In Abhängigkeit des jeweiligen Befundes wurde dem Tier pro Kategorie ein Score von 0 bis 3 vergeben. Betrug die Gesamtpunktzahl  $\geq 9$  oder die Punktzahl eines Einzelkriteriums 3, so wurde das Tier aus dem Versuch genommen und getötet. Die einzelnen Parameter mitsamt der entsprechenden Bewertungskriterien und zu erreichenden Punkte sind im Anhang (B) zu finden.

## 4.2 Isolation der Pankreasinseln

### 4.2.1 Anfärbung und Organentnahme

Es wurde ein mindestens zehn Wochen altes Spender-Tier (gleicher Stamm wie Empfänger) durch intraperitoneale Injektion von Xylazin ( $0,08 \frac{\text{mg}}{\text{gKG}}$ , Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling/ Deutschland) und Ketamin ( $0,04 \frac{\text{mg}}{\text{gKG}}$ , Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling/ Deutschland) narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose wurde das Tier auf dem OP-Tisch fixiert, im abdominellen Bereich desinfiziert und mittels einer Gefäßschere und Pinzette die Bauchdecke mitsamt Peritoneum eröffnet.

Das Dünndarmkonvolut wurde zur Seite mobilisiert und die abdominale Aortenbifurkation mit zwei Irispinzetten unter dem Stereomikroskop freipräpariert. Mittels einer Venenpunktionskanüle („Venofix A“, G25,  $0,5 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ ; B. Braun Melsungen AG, Melsungen/Deutschland) wurde die Aortenbifurkation punktiert und die Neutralrotlösung (10 mg Neutralrot/500 ml NaCl; Carl-Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland) injiziert. Die Vena cava inferior wurde hinter der Leber zur Unterbrechung des Blutkreislaufs eröffnet. Nach circa 60 ml Neutralrotlösung sollte sich das Pankreas vollständig dunkelrot angefärbt haben, sodass mithilfe von zwei Irispinzetten (Größe: 100 mm, 4; Aesculap AG, Tuttlingen/Deutschland) das Pankreas entnommen und in Eis gekühlter HANKS-Lösung (50 ml HANKS/500 ml aqua dest.; SIGMA Life Science ALDRICH, St. Louis/USA) aufbewahrt werden konnte. Insgesamt wurden pro Versuch sieben Pankreata benötigt.

### 4.2.2 Zerschnitt und enzymatischer Verdau

Die gewonnenen Pankreata wurden mittels Rasierklingen („Cromablades“, Klingienstärke 0,1 mm; Feintechnik GmbH Eisfeld, Eisfeld/Deutschland) fein zerschnitten. Um eine ausrei-

chende Vitalität des Gewebes zu erhalten, sollte der Zerschnitt insgesamt nicht länger als 25 min dauern und das Gewebe in Eis gekühlter HANKS-Lösung gelagert werden.

Das zerschnittene Pankreasgewebe wurde mit zwei 5 ml-Spritzen mitsamt der HANKS-Lösung aufgezogen. Nach Sedimentation wurde die überschüssige Flüssigkeit entfernt und das Pankreasgewebe in einen erwärmten Erlenmeyerkolben zu den Enzymen (Albumin: 7 mg, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg/Deutschland; Collagenase: 14 mg, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg/Deutschland) für den Verdau gegeben. Die enzymatische Reaktion erfolgte für circa 9 min (je nach Pankreasmenge) im Wärmeschrank bei 37,1 °C. Zur besseren Durchmischung wurde ein kleiner Magnetrührer bei niedriger Drehgeschwindigkeit verwendet. Um die enzymatische Reaktion zu beenden wurde das Reagenz auf in Eis deponierte, mit frischer HANKS-Lösung befüllte Reagenzgläser gegeben und durchmischt. Nach 8 min hatte sich das Gewebe abgesetzt, sodass die überschüssige Flüssigkeit mittels einer Saugpipette entfernt, durch neue HANKS-Lösung ersetzt und erneut durchmischt wurde. Dieser Spülvorgang wurde in 8 min-Intervallen insgesamt vier mal wiederholt.

### 4.2.3 Isolation der Pankreasinseln

Eine kleine Menge des verdauten Gewebes wurde in eine Petrischale gegeben, um unter einem Stereomikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar/ Deutschland; Olympus Biosystems GmbH, Planegg/ Deutschland) die intakten Pankreasinseln zu isolieren. Letztere stellten sich durch die Neutralrotgabe in Abgrenzung zum exokrinen Gewebe als rundliche, rot bis dunkelrot gefärbte Strukturen dar. Insgesamt wurden pro Empfängertier circa 200 Inseln gewonnen und für die Transplantation in einem Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß gekühlt gelagert.

## 4.3 Inseltransplantation

### 4.3.1 Vorbereitung des Transplantationssystems

Es wurde eine 1,0 ml-Spritze mit kalter HANKS-Lösung befüllt. Von einer Verlängerungsleitung (Heidelberger Exentsion Type, 30 cm, 1,2 mm × 2,2 mm; B. Braun Melsungen AG, Melsungen/Deutschland) wurde ein Ende abgetrennt, an die Spritze angeschlossen und durchgespült. In der Spritze wurden 0,05 ml belassen. Aus dem Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß wurden die Pankreasinseln aufgesogen, sodass sich die Inseln in der Verlängerungsleitung befanden. War das System befüllt, so wurde eine zugeschnittene Einweg-Subkutannadel („Agani Needle“, 26G, 0,45 mm × 23 mm; SHINE Corp. GmbH, Hamburg/Deutschland) am freien Ende des Schlauchs inseriert und mit Sekundenkleber („UHU Minis“, flüssig, Einkomponenten-Reaktionsklebstoff, Cyanacrylsäureethylester; UHU GmbH und Co.KG, Bühl/-Deutschland) befestigt. Bis zum Beginn der Transplantation wurde das System auf Eis gelagert.



### 4.3.2 Transplantation der Pankreasinseln

Eine circa zehn Wochen alte Maus ( $KG \geq 20$  g, wenn diab.  $BZ = \geq 16,8 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ ) wurde narotisiert (Xylazin ( $0,08 \frac{\text{mg}}{\text{gKG}}$ ; Ketamin ( $0,04 \frac{\text{mg}}{\text{gKG}}$ , s.o) und deren Fell im Bauchbereich abgeschoren. Die Maus wurde auf dem durch eine befestigte Wärmeplatte („Terra Mat 5“, 5 W,  $14 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$ ; GarPet GmbH und Co. KG, Cadolzburg/Deutschland) gewärmten OP-Tisch fixiert und die Bauchhaut mit 70%-igem Alkohol (Ethanol 70%; Universitätsapothek Greifswald, Greifswald/Deutschland) desinfiziert sowie mit einem OP-Tuch („Steri Drape“,  $5 \text{ cm} \times 7,5 \text{ cm}$  (zugeschnitten); 3M Health Care, Neuss/Deutschland) abgedeckt. Mit Hilfe eines Skalpels wurde das Abdomen durch einen Längsschnitt eröffnet. Das Peritoneum wurde mithilfe einer Gefäßschere durchtrennt. Um zur Vena portae gelangen zu können, wurde das Darmkonvolut vorsichtig nach extrakorporal verlagert. Nach Freilegung der Vene wurde diese mit zwei feuchten Wattestäbchen fixiert. Unter Sicht durch das Stereomikroskop wurde das Gefäß mithilfe des Transplantationssystems (siehe 4.3.1) punktiert und die 200 Pankreasinseln injiziert. Nach erfolgter Punktion wurde die Läsion der Gefäßwand mittels eines schmalen Stempels zur Blutstillung (etwa 7 min) komprimiert. Während des Eingriffs wurde der Darm durch Beträufeln mit steriler, warmer ( $37,5^\circ\text{C}$ ) NaCl-Lösung („mini-plasco connect“, Natriumchlorid 0.9 %, 0.09g/10 ml; Braun AG, Melsungen/Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt.

Am Ende der Transplantation wurde der Darm in den Bauchraum rückverlagert und das Peritoneum durch eine fortlaufende Naht mit einem nicht resorbierbaren Faden („Marilon“, Polyvinylidenfluorid, monofil, 5/0 USP; Catgut GmbH, Markneukirchen/Deutschland) wieder verschlossen und desinfiziert („Sensiva“, Schülke Mayr GmbH, Norderstedt/ Deutschland). Die Hautwunde wurde mit Hilfe einer Klammernaht (Wundklammern,  $7,5 \text{ mm} \times 1,75 \text{ mm}$ ; Aesculap AG, Tuttlingen/Deutschland) versorgt und ebenfalls desinfiziert („Sensiva“, s.o). Die Mäuse wurden in einen erwärmten Käfig gelegt und solange beobachtet, bis sie wieder vollständig erwacht waren.

## 4.4 Verlaufskontrolle und Überwachung des Wohlbefindens

Je nach Versuchsgruppe wurden ab Zeitpunkt des Versuchsbeginns in unterschiedlichen Intervallen Gewicht, Blutzucker (mittels Schwanzvenenpunktion) und Allgemeinzustand erhoben. Bei diabetischen Tieren wurden in der ersten Woche nach Transplantation alle zwei Tage das Gewicht (g) und der Blutzucker ( $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ ) gemessen sowie der Allgemeinzustand (Score) bewertet. Von der zweiten bis zur fünften Woche wurden diese Werte wöchentlich kontrolliert, danach bis zum entsprechenden Versuchsende ein mal im Monat. Bei nicht diabetischen, transplantierten Tieren galt dies entsprechend, mit der Ausnahme, dass die engmaschige Kontrolle während der ersten Woche entfiel und die Wert in dieser Woche einmalig bestimmt wurden. nicht diabetische und diabetische Tiere ohne Transplantation wurden innerhalb des ersten Versuchsmonats wöchentlich gemessen, anschließend erfolgte die Kontrolle einmal im Monat bis Versuchsende.

Wurde bei einem Tier ein schlechter Gesundheitszustand (Score  $\geq 9$  oder Einzelwert von 3) festgestellt (siehe 4.1.4), so wurde das Tier aus dem Versuch genommen und getötet.

#### 4.4.1 Implantation von Insulinsticks

Falls diabetische Tiere einen schlechten Allgemeinzustand (ab Gesamtscore  $\geq 3$ ) aufwiesen, ein starker Gewichtsverlust ( $\geq 15\%$ ) und ein hoher Blutzucker ( $\geq 25 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ ) vorlag, so wurde der betroffenen Maus ein Insulinstick („Lin $\beta$ -it“,  $0,1 \frac{\text{U}}{24\text{h}}$ ; Linshin Canada Inc., Toronto/-Canada) ins subkutane Fettgewebe am Rücken implantiert. Dazu wurde die Maus mittels Ätherkurznarkose betäubt. Nach Desinfektion (Sensiva, s.o) wurde die Rückenhaut mit den Fingern fixiert und der Insulinstick über einen Trokar ins Gewebe eingebracht. Um den therapeutischen Erfolg und die Auswirkungen auf den Stoffwechsel evaluieren zu können, wurden BZ und Gewicht für die nächsten vier Wochen wöchentlich gemessen.

### 4.5 Versuchsende- Perfusion und Fixation

#### 4.5.1 Applikation von 5-Bromo-2‘desoxyuridin

Damit eine Auswertung und Analyse der Proliferationsaktivität anhand der BrdU-Reaktion (4.8.2) möglich ist, wurde den Tieren vor ihrem Tod 5-Bromo-2‘desoxyuridin (BrdU) verabreicht. Dazu wurden den Mäusen sieben Tage vor der Perfusion eine osmotische Pumpe („alzet mini osmotic pump 2001“,  $1,0 \frac{\mu\text{l}}{\text{h}}$ ; DURECT Corporation, Cupertino/Kalifornien) in das subkutane Rücken Fett implantiert, um eine kontinuierliche BrdU- Applikation zu erreichen. Diese wurde zuvor dem Füllungsvolumen entsprechend mit etwa 0,2 ml BrdU-Lösung (20 mg BrdU/ml NaCl; SIGMA Life Science ALDRICH, St. Louis/USA) befüllt. Für die Implantation wurde die Maus mittels Ätherkurznarkose betäubt und der Rücken großflächig desinfiziert („Sensiva“, s.o). Mit einer chirurgischen Pinzette wurde die Haut angehoben und mittels Feinschere über einen horizontalen Schnitt ein kleiner Zugang geschaffen. Die Schere wurde im geschlossenen Zustand eingeführt, etwas gespreizt und dabei wieder herausgezogen. In den dadurch geschaffenen Raum wurde die BrdU-Pumpe deponiert, der Hautschnitt mit Klammernähten (Wundklammern Michel,  $7,5 \mu\text{m} \times 1,75 \mu\text{m}$ ; Aesculap AG, Tuttlingen/Deutschland) verschlossen und abschließend desinfiziert („Sensiva“, s.o.).

#### 4.5.2 Perfusion und Fixation

Am Versuchsende wurde die Maus noch einmal gewogen (g), ihr Blutzucker ( $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ ) gemessen sowie ihr Allgemeinzustand (Score) bewertet. Danach wurde sie narkotisiert (Xylazin ( $0,08 \frac{\text{mg}}{\text{gKG}}$ ; Ketamin ( $0,04 \frac{\text{mg}}{\text{gKG}}$ , s.o), am Bauch rasiert und nach Fixierung auf dem OP-Tisch im Bauchbereich mit 70 %-igem Alkohol desinfiziert. Bauchhaut, Peritoneum und Bauchraum wurden wie bei der Pankreasentnahme (siehe 4.2.1) eröffnet. Das Dünndarmkonvolut wurde zur Seite mobilisiert und die Aorta auf Höhe der Bifurkation -wie bei der Pankreas isolation (siehe 4.2.1)- freigelegt. Mit Hilfe des Stereomikroskops wurde ein Venenverweil-

katheter („BD-Insyste-N“ mit Flügeln, 24 G, 0,7 mm × 14 mm; Becton Dickinson Infusion Therapy Systems, Utah/USA) in die abdominale Aorta eingebracht, wobei durch Festhalten der rechten Iliakalarterie mit einer Irispinzette die Bifurkation in Position gehalten wurde.

Mithilfe eines Mikroreagenzgefäßes wurden einige Blutstropfen für die Serumsgewinnung aufgefangen. Danach wurde der gelegte Zugang mit Autoklavierband fixiert und die Spüllösung (Zusammensetzung siehe C.1) infundiert. Begann sich die Vena cava inferior zu stauen, so wurde der Blutkreislauf durch deren Einschneiden unterhalb der Leber eröffnet. Außerdem wurde der Thorax eröffnet, indem das Sternum, der laterale Brustkorb sowie die diaphragmale Pleura parietalis durchtrennt wurden. Dadurch sollte durch Verbesserung der Druckverhältnisse eine bessere Spülbarkeit erreicht werden.

### 4.5.3 Organ- und Gewebsentnahme

Begonnen wurde mit der Organentnahme durch Entfernen der linken Niere. Diese wurde nach ausreichender Spülung und Anlage einer Gefäßklemme am Hilus von den versorgenden Gefäßen getrennt und vom umliegenden Fettgewebe gelöst. Zudem wurde etwas Pankreasgewebe und nach dessen Abklemmen der hepatische Mittellappen entnommen. Parallel zu den oben beschriebenen Arbeitsschritten wurden die frisch entnommenen Organe bzw. -teile genauer auf etwaige Läsionen wie Zysten, Tumoren oder Einblutungen untersucht, weiter zugeschnitten und diese in der jeweiligen Lösung konserviert: die linke Niere wurde längs in zwei etwa gleich große Hälften zerteilt, von denen eine über Methylbutan (2-Methylbutan  $\geq 99\%$ , Carl-Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland) eingefroren ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde.

Von der zweiten Hälfte wurden noch kleine, etwa  $2\text{ mm}^3$  große Stücke in  $\text{OsO}_4$  ( $\geq 99,95\%$ ; Carl-Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland) und der verbleibende Teil in gepuffertem Formalin (4,5%; Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald/Deutschland) fixiert. Ebenso wurde mit Teilstücken vom Pankreas und Lebergewebe verfahren. Nach Durchlaufen der Fixationslösung wurden das Herz und beide Lungenflügel entnommen und in Formalin (4,5 %; s.o) fixiert. Anschließend wurden die rechte Niere, ein Stück vom Duodenum sowie die Leber (ohne Mittellappen) in Nachfixationslösung (Zusammensetzung siehe C.3) gelagert. Einer der Hoden, ein Stück des m. Iliopsoas, das Mesenterium und die Milz wurden entnommen und in Formalin (4,5 %; s.o) konserviert.

Die entnommenen Proben für die Elektronenmikroskopie wurden unter einem Abzug in  $\text{OsO}_4$  umbettet und auf Eis gelagert. Nach zwei Stunden wurden diese wieder entnommen und schließlich mit Cacodylatpuffer (0,1 mol; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg/-Deutschland) abgepuffert. Die in Formalin und Nachfixationslösung gelagerten Organe bzw. Gewebe wurden zur weiteren Bearbeitung bereitgestellt.

## 4.6 Zuschnitt- weiterführende Verarbeitung der Proben

Jedes Organ wurde noch einmal auf makroskopisch sichtbare (pathologische) Veränderungen kontrolliert. Falls solche zu erkennen waren, wurden die entsprechenden Organe vor dem endgültigen Zuschnitt fotografiert. Zudem wurden pro Versuchsgruppe mindestens zwei Fotografien der Nieren angefertigt. Bei Tumoren und zystischen Läsionen wurde nachträglich eine Probe für die Elektronenmikroskopie gewonnen, sofern dies nicht bereits im Rahmen der Perfusion erfolgt war. Die Niere wurde halbiert und zwei etwa 2 mm<sup>3</sup> große Stücke in Glutaraldehydlösung (25 %; Merck KGaA, Darmstadt/ Deutschland) fixiert. Die Leber wurde in 1 bis 2 mm breite Lamellen zerteilt und wie die anderen Organe in Paraffin (Paraplast PLUS; Leica Biosystems GmbH, Nussloch/Deutschland) eingebettet.

## 4.7 Paraffineinbettung und Anfertigung histologischer Schnitte

Die Kapseln wurden im weiteren Verlauf in Paraffin (Paraplast PLUS; Leica Biosystems GmbH, Nussloch/Deutschland) eingebettet und anschließend histologische Schnitte angefertigt. Diese wurden dann ihrer Fragestellung entsprechend gefärbt (HE; PAS-Reaktion, siehe D; BrdU-Reaktion, siehe E).

## 4.8 Auswertungsverfahren

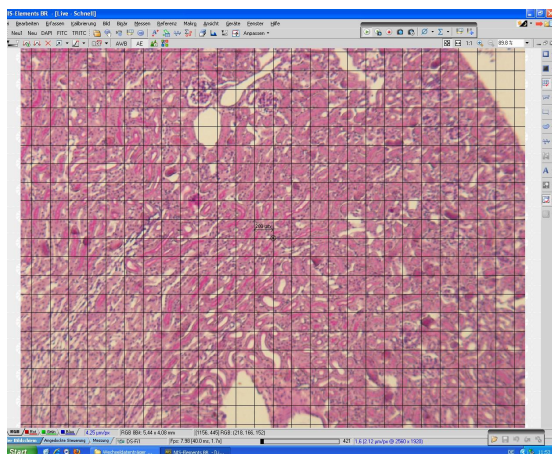
Die Auswertung *aller* histologischen Schnitte fand an einem PC statt, der über eine Kamera (Nikon DS-Fi1; Nikon Corporation, Tokio/Japan) mit einem Mikroskop (Leica DMRB 301; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar/Deutschland) verbunden war. Die Auszählung der Präparate wurde mithilfe des Programms NIS Elements BR 3.2 (Version 2011) durchgeführt.

### 4.8.1 Glykogenotische Veränderungen

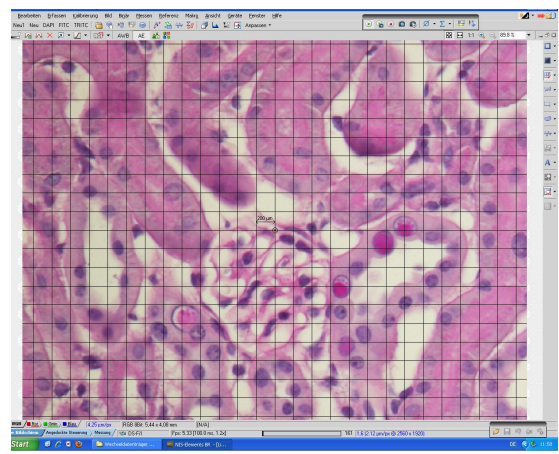
**PAS-Reaktion** Um Glykogenspeicherkerne (GSK) und Armanni-Ebstein-Läsionen (AEL) als Zeichen für glykogenotische Veränderungen in den renalen Tubulusepithelien nachweisen zu können, wurden diese mit Hilfe der PAS- Reaktion (Periodsäure-Schiff-Reaktion) dargestellt. Bei dieser werden mithilfe von Periodsäure die freien OH-Gruppen der Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen oxidiert. Diese reagieren wiederum mit dem Schiff'schen Reagenz, das durch die damit verbundene Strukturänderung eine chromogene Eigenschaft erlangt und sich rot färbt [64, 53]. Folglich färbt sich in den Kern (=GSK) und/ oder ins Zytoplasma (=AEL) eingelagertes Glykogen mangentarot. Ebenso reagiert die gut ausgeprägte Glykokalix des proximalen Tubulusepithels, sodass eine Unterscheidung zwischen distalen und proximalen Tubuli möglich ist. Unter Einsatz der Elektronenmikroskopie konnte für die hier untersuchten renalen Veränderungen gezeigt werden, dass es sich bei den PAS positiven Korrelaten um eingelagertes Glykogen handelt (siehe 3.5).

**Glykogenspeicherkerne** Das Auftreten von GSK wurde durch das Zählen von PAS positiven Tubuluszellkernen bestimmt. Es wurden insgesamt 15 Gesichtsfelder (Gesamtgröße=  $336 \text{ mm}^2$ ) bei einer 400-fachen Vergrößerung unter Zuhilfenahme eines Zählrasters (560 Kästchen, Kästchengröße=  $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ ) ausgezählt. Ein solches Gesichtsfeld (Größe=  $22,4 \text{ mm}^2$ ) mit verwendetem Raster ist in Abb. 4.1 dargestellt. Die Auswahl der jeweiligen Gesichtsfelder erfolgte so, dass die auszuwertenden Areale im Bereich der oberflächlichen bis tieferen Nierenrinde zufällig gewählt wurden. Es wurden pro Gesichtsfeld sowohl alle PAS positiven als auch alle negativen Zellkerne des Tubulusepithels gezählt. Dabei erfolgt eine Unterscheidung zwischen proximalen und distalen Tubuli. Es wurden mindestens 900 Zellkerne (proximal und distal zusammen) ausgezählt.

**Armani-Ebstein-Läsionen** Die Armani-Ebstein-Läsionen als intrazytoplasmatische Glykogeneinlagerungen wurden über die Bestimmung des Flächeninhalts mittels des Punktzählverfahrens nach Weibel [118, 119, 120] erfasst. Hierfür wurde ebenfalls ein Zählraster (s.o.) verwendet. Als PAS positiv wurde jedes Kästchen gezählt, das zu mehr als 50% betroffen war. Außerdem wurde ein Kästchen nur als positiv gewertet, wenn es sich bei der betroffenen Struktur um einen proximalen oder distalen Tubulus handelte. Die Auszählung der betroffenen Fläche erfolgte auch hier bei einer 400-fachen Vergrößerung. Es wurden die selben Gesichtsfelder wie bei der Auswertung der GSK ausgezählt.



(a) Auswertungsraster (Übersicht). Färbung: HE. Länge untere BK: 2,5 mm



(b) verwendetes Gesichtsfeld. Färbung: HE. Länge untere BK: 0,25 mm

Abbildung 4.1: exemplarische Darstellung der Auswertungsoberfläche (a) und des für die Auszählung verwendeten Gesichtsfeldes (b).

### 4.8.2 Proliferationsaktivität

**BrdU-Reaktion** Für die Bewertung der Proliferationsaktivität war es erforderlich, dass die Mäuse vor ihrem Tod Bromdesoxyuridin (BrdU) erhielten (siehe 4.5.1). Bei BrdU handelt es sich um eine Verbindung aus Desoxyribose und der Nucleinsäure 5-Bromuracil. Nach Aufnahme in die Zelle wird es als Nukleotid-Analogon anstelle von Thymidinphosphat während der DNA- Replikation in die DNA eingebaut. Dieses kann, sofern die Zelle sich in Teilung befindet, im Zellkern mittels BrdU spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Ist eine Zelle BrdU positiv, so färbt sich der Zellkern rötlichbraun [81].

Die Kombination mit der PAS-Reaktion diente dazu, gleichzeitig auch den Grad der Glykogenose bewerten und einen potentiellen Zusammenhang zum Proliferationsverhalten erkennen zu können. Außerdem ließen sich so proximale und distale Tubuli besser unterscheiden (siehe Glykogenotische Veränderungen).

**Auszählung** Die Proliferationsaktivität der renalen Tubulusepithelzellen wurde anhand der Auszählung BrdU positiver Zellkerne als Anteil BrdU positiver Zellkerne auf 100 Tubulusepithelzellkerne (=BrdU-Labeling-Index, BrdU-LI) ermittelt untersucht. Unter Einsatz eines Zählrasters (siehe Abb. 4.1) wurden sowohl die positiven als auch die negativen Zellkerne im jeweiligen Gesichtsfeld (Größe=22,4mm<sup>2</sup>) ausgezählt und dabei zwischen proximalen und distalen Tubuli unterschieden. Auch hier wurden insgesamt 15 zufällig gewählte Gesichtsfelder pro Tier ausgewertet und mindestens 900 Zellkerne ausgezählt. Zudem wurde mithilfe der kombinierten PAS-Reaktion das Vorkommen von AEL und GSK entsprechend dem Verfahren bei alleiniger PAS-Reaktion (s.o) dokumentiert und eine Unterscheidung zwischen proximal und distal vorgenommen, um die Verteilung der positiven Zellkerne auf das proximale bzw. distale Tubulusepithel bestimmen zu können.

### 4.8.3 Nierentumoren

Im Hinblick auf die Nierentumoren wurde deren Auftreten in Abhängigkeit der Versuchsgruppe, des -zeitraums sowie des Genotyps untersucht. Dazu wurde dokumentiert, wie viele Tumoren innerhalb der jeweiligen Wildttyp- und ChREBP-Knockout-Gruppe entstanden sind. Histologisch erfolgte eine Untersuchung der Tumoren anhand der HE-Färbung, der PAS- sowie der BrdU-Reaktion. Es wurden dabei deren wesentlichen morphologischen Merkmale wie Wachstumsmuster, Begrenzung und Zytologie (Zellgröße, Zellform Zytoplasma, Beschaffenheit des Zellkerns, Differenzierungsgrad) beurteilt. Zudem wurde überprüft, ob die Tumorzellen Glykogeneinlagerungen (mittels PAS-Reaktion) aufwiesen sowie deren Proliferationsaktivität (BrdU-Reaktion) semiquantitativ bestimmt.

Eine aufgetretene Epithelläsion wurde dann als Adenom definiert, wenn sie als Raumforderung von mindestens 1,00 mm Größe auftrat, eine veränderte, häufig basophile Differenzierung aufwies und das angrenzende Nierenparenchym leicht verdrängte. Adenome wiesen keine wesentlichen Zellatypien auf. Karzinome wurden definiert als Tumoren von mindestens

3,00 mm Größe, einem unscharf begrenztem Wachstum bzw. einer Invasion des angrenzenden Nierengewebes sowie Läsionen mit nachweisbaren Zelltypen, Pleomorphien und Mitosen.

## 4.9 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden mithilfe des Statistikprogramms RStudio (Version 1.1.463; 2018) ausgewertet. Zunächst wurden diese mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Lag eine solche vor, so wurde der t-Test für die Signifikanztestung verwendet. Waren die Daten nicht normalverteilt, so wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=0,05$  festgelegt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Blutzucker

Um den Blutzucker der Versuchsgruppen miteinander vergleichen zu können, wurden für jedes Tier mehrere Blutzuckerwerte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (siehe 4.4) erhoben. Für jedes Tier wurde dann entsprechend der durchschnittliche Blutzucker für den Versuchszeitraum berechnet. Jedes Tier erhielt somit einen mittleren Blutzuckerwert für den gesamten Versuchszeitraum. Diese Mittelwerte stellten die repräsentativen Gruppenwerte, die als Grundlage für die weitere statistische Auswertung des Blutzuckers dienten, dar.

#### 5.1.1 C57BL/6J-Wildtyp-Stamm bei 3-monatiger Versuchsdauer

Bei den drei Monate alten Tieren des Wildtyp-Stammes zeigt sich, dass der durchschnittliche Blutzucker (BZ) von nicht diabetischen Tieren ohne Transplantation  $8,87 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,10$  (=Mittelwert  $\pm$ SEM, Standardfehler des Mittelwerts) beträgt, während die transplantierten Tiere einen BZ von  $8,30 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,12$  aufweisen. Diese unterscheiden sich signifikant ( $p=0,00344$ ) voneinander. Prozentual beträgt der Unterschied circa 6,43%. Den höchsten BZ weisen die diabetischen, nicht transplantierten Tiere mit  $22,87 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,89$  auf. Diese unterscheiden sich nicht signifikant von der diabetischen *und* transplantierten Gruppe. Siehe hierzu 5.1.

#### 5.1.2 ChREBP-Knockout-Stamm bei 3-monatiger Versuchsdauer

Im Durchschnitt beträgt der BZ der nicht diab. Gruppe  $8,61 \text{ mmol/l} \pm 0,22$ . Die Tiere, die zusätzlich eine Transplantation erhalten haben, weisen einen BZ von  $8,82 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,23$  auf. Beide unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, der prozentuale Unterschied beträgt 2,38%. Der BZ von den diabetischen Tieren liegt mit  $27,53 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 1,68$  am höchsten. Bei den transplantierten *und* diabetischen Tiere beträgt er  $25,83 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,68$ . Beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Ergänzend siehe Tab. 5.1.

#### 5.1.3 Vergleich zwischen C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm bei drei Monaten Versuchsdauer

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht diabetischen Tieren ohne Transplantation. Tatsächlich weichen beide nur um circa 2,93% voneinander ab. Auch die Gruppen der nicht diabetischen, transplantierten Mäuse unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, während die diabetischen Tiere ohne Transplantation des Knockout-Stammes einen um 16,93% höheren BZ als die Vergleichsgruppe des Wildtyps aufweisen ( $p=0,01766$ ). Auch die diabetischen *und* transplantierten Knockout-Tiere haben einen etwa 16,96% höheren BZ als die entsprechenden Wildtypiere ( $p=0,0005374$ ).



Gruppe	N	BZ ( $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ ) MW $\pm$ SEM	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
WT nicht diabetisch./ nicht transplantiert	10	8,87 $\pm$ 0,1	—
WT diabetisch/ nicht transplantiert	10	22,87 $\pm$ 0,89	§
WT nicht diabetisch/ transplantiert	10	8,3 $\pm$ 0,12	§, #
WT diabetisch/ transplantiert	19	21,45 $\pm$ 0,83	—
KO nicht diabetisch/ nicht transplantiert	10	8,61 $\pm$ 0,22	—
KO diabetisch/ nicht transplantiert	10	27,53 $\pm$ 1,68	§
KO nicht diabetisch/ transplantiert	8	8,82 $\pm$ 0,23	—
KO diabetisch/ transplantiert	9	25,83 $\pm$ 0,68	§

Tabelle 5.1: BZ-Werte des Wildtyp- und Knockout- Stammes nach drei Monaten. WT, Wildtyp; KO, ChREBP-Knockout; BZ, Blutzucker; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; §, 3M. gegen 6M.; §, WT gegen KO.

#### 5.1.4 C57BL/6J-Wildtyp-Stamm bei 6-monatiger Versuchsdauer

Für die sechs Monate alten Versuchstiere zeigt sich, dass der BZ der gesunden, nicht transplantierten Mäuse bei  $7,97 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,20$  liegt. Der BZ der gesunden Tiere mit Transplantation liegt mit  $8,91 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,25$  um 10,50% höher ( $p=0,009658$ ). Die Gruppe der diabetischen, nicht transplantierten Tiere weisen einen BZ von  $27,87 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,56$  auf, während dieser bei den diabetischen *und* transplantierten Mäusen mit  $21,49 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,99$  um 22,89% niedriger ist. Siehe hierzu Tab. 5.2.

#### 5.1.5 ChREBP-Knockout-Stamm bei 6-monatiger Versuchsdauer

Die nicht-transplantierten, nicht diabetischen Tiere des Knockout-Stammes weisen bei einer Versuchsdauer von sechs Monaten einen BZ von  $8,31 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,20$ , während der BZ von gesunden, transplantierten Knockout-Tieren  $8,69 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,26$  beträgt. Prozentual weichen beide um 4,37% ab. Die diabetischen Tiere ohne Transplantation weisen einen BZ von  $25,04 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,72$ , die diabetischen *und* transplantierten Mäuse einen von  $26,25 \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \pm 0,57$  auf. Damit liegen beide Gruppen um circa 4,61% auseinander. Zusammenfassend siehe Tab. 5.2.

### 5.1.6 Vergleich zwischen C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm bei sechs Monaten Versuchsdauer

Im Vergleich beider Tierstämme lässt sich sagen, dass sich die nicht transplantierten und die transplantierten Tiere sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. In Bezug auf die diabetischen Tiere fällt auf, dass die Knockout-Tiere ohne Transplantation einen um 10,15% niedrigeren BZ aufweisen als die Vergleichsgruppe des Wildtyps ( $p=0,008442$ ), während der BZ-Spiegel der diabetischen *und* transplantierten Knockout-Mäuse um 18,13% über dem des Wildtyps liegt ( $p=0,0001911$ ).

Gruppe	N	BZ ( $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ ) MW $\pm$ SEM	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
WT nicht diab./ nicht Tx	10	7,97 $\pm$ 0,2	—
WT diab./ nicht Tx	6	27,87 $\pm$ 0,56	§, *
WT nicht diab./ Tx	10	8,91 $\pm$ 0,25	#
WT diab./ Tx	20	21,49 $\pm$ 0,99	§
KO nicht diab./ nicht Tx	8	8,31 $\pm$ 0,20	—
KO diab./ nicht Tx	9	25,04 $\pm$ 0,72	§
KO nicht diab./Tx	10	8,69 $\pm$ 0,26	—
KO diab./Tx	9	26,25 $\pm$ 0,57	§

Tabelle 5.2: BZ-Werte des Wildtyp- und Knockout- Stammes nach sechs Monaten. WT, Wildtyp; KO, ChREBP-Knockout; BZ, Blutzucker; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; §, 3M gegen 6M.; §, WT gegen KO.

## 5.2 Glykogenotische Veränderungen in der Niere

### 5.2.1 C57BL/6J-Wildtyp-Stamm nach 3- monatiger Versuchsdauer

**Vorkommen GSK** Bei den Mäusen des C57BL/6J-Wildtyps kommen Glykogenspeicherkerne (GSK) nur im distalen Tubulusepithel von diabetischen Tieren vor. Im Vergleich zum Normalgewebe (=nicht diab./nicht Tx) ist deren Vorkommen deutlich erhöht (diab.:  $p=6,386 \cdot 10^{-5}$ ; diab./Tx.:  $9,562 \cdot 10^{-6}$ ). Vergleicht man die diabetischen Tiere untereinander, so weisen die Mäuse ohne Transplantation ( $6,34\% \pm 0,39$ ) im Vergleich zur transplantierten *und* diabetischen Gruppe ( $3,28\% \pm 0,28$ ) mehr GSK auf ( $p=1,897 \cdot 10^{-6}$ ) Siehe hierzu Abb. 5.1 und Tab. 5.3.

**Vorkommen AEL** Auch Armanni-Ebstein-Läsionen (AEL) kommen bei C57BL/6J-WT-Tieren nur bei Vorliegen eines Diabetes vor. Bei den diabetischen Tieren ( $0,36\% \pm 0,05$ )

beträgt der Anteil von AEL im Durchschnitt mehr als bei den transplantierten und diabetischen Tieren ( $0,16\% \pm 0,07$ ) ( $p=0,0001506$ ). Bezogen auf das Normalgewebe treten in beiden Gruppen (diab.:  $p=6,34 \cdot 10^{-5}$ ; diab./Tx:  $p=0,0001312$ ) mehr AEL auf. Dabei entfallen auf das proximale Tubulusepithel bei den diabetischen Tieren ohne Transplantation  $50,85\% \pm 5,64$  der gezählten AEL, während bei den transplantierten *und* diabetischen  $58,44\% \pm 2,34$  bei proximalen Tubuluszellen vorkommen. Ergänzend siehe Abb. 5.1 und Tab. 5.4.

### 5.2.2 ChREBP-Knockout-Stamm nach 3- monatiger Versuchsdauer

**Vorkommen GSK** Bei den ChREBP-Knockout-Tieren kommen Glykogenspeicherkerne nur beim distalen Tubulusepithel im Rahmen eines Diabetes vor. Im Hinblick auf das Normalgewebe ist deren Vorkommen signifikant (diab.:  $p=6,386 \cdot 10^{-5}$ ; diab./Tx:  $p=8,536 \cdot 10^{-5}$ ). Die diabetischen ChREBP-Knockout-Tiere mit ( $7,82\% \pm 0,85$ ) und ohne Transplantation ( $10,02\% \pm 1,34$ ) zeigen dagegen ein ähnlich großes Vorkommen an GSK. Siehe hierzu Abb. 5.1 und Tab. 5.3.

**Vorkommen AEL** AEL sind bei ChREBP-Knockout-Mäusen nach 3-monatiger Versuchsdauer nur bei Diabetes zu beobachten. Im Bezug zum normalen Nierengewebe besteht dabei ein signifikanter Unterschied (diab.:  $p=6,386 \cdot 10^{-5}$ ; diab./Tx:  $p=8,536 \cdot 10^{-5}$ ). Im Vergleich miteinander unterscheiden sich die diabetischen ( $2,19\% \pm 0,30$ ) sowie diabetischen *und* transplantierten Tiere ( $1,64\% \pm 0,17$ ) nicht. Auffällig ist zudem, dass ein Großteil der AEL auf die proximalen Tubuli entfällt (diab.:  $89,67\% \pm 3,12$ ; diab./Tx:  $94,72\% \pm 1,38$ ). Siehe hierzu Abb. 5.1 sowie Tab. 5.4.

### 5.2.3 Glykogenotische Veränderungen bei C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm nach drei Monaten im Vergleich

Vergleicht man das Auftreten von GSK zwischen den beiden Tierstämmen nach 3 Monaten (Siehe Tab. 5.3), so fällt auf, dass die diabetischen Knockout-Tiere mehr GSK als der jeweilige WT-Stamm aufweisen (diab.:  $p=0,02375$ ; diab./Tx  $p=0,0005196$ ). Bei beiden kommen GSK nur im distalen Tubulusepithel im Rahmen eines Diabetes vor.

Im Bezug auf das Vorkommen von AEL (Siehe Tab. 5.4) fällt auf, dass die ChREBP-Knockout-Tiere im Vergleich zu den C57BL/6J-Wildtyp-Tieren sowohl mit ( $p=5,413 \cdot 10^{-5}$ ) als auch ohne Transplantation ( $p=0,0001513$ ) deutlich mehr aufweisen.

Hinsichtlich der Verteilung der AEL ist zu beobachten, dass bei den Wildtyp-Tieren die AEL sich relativ ausgeglichen auf die distalen und proximalen Tubuluszellen verteilen, während beim Knockout-Stamm wesentlich mehr auf die proximalen Tubuli entfallen. Auch diese kommen nur bei Diabetes vor.

<b>Gruppe</b>	<b>N</b>	<b>GSK (in%) MW <math>\pm</math>SEM</b>	<b>Signifikanz (<math>p &lt; 0,05</math>)</b>
WT diabetisch/ nicht transplantiert	10	6,34 $\pm$ 0,39	§, #, *,***
WT diabetisch/ transplantiert	19	3,28 $\pm$ 0,28	§, \$, #, **,***
KO diabetisch/ nicht transplantiert	10	10,02 $\pm$ 1,34	§, \$, #,***
KO diabetisch/ transplantiert	9	7,82 $\pm$ 0,85	§, #,***

Tabelle 5.3: Vorkommen (in %) von Glykogenspeicherkernen (GSK) im distalen Tubulusepithel nach 3-monatiger Versuchsdauer beim Wildtyp- (WT) und Knockout-Stamm (KO). N, Tierzahl; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; \$, 3M. gegen 6M.; §, WT gegen KO.

<b>Gruppe</b>	<b>N</b>	<b>AEL (in%) MW <math>\pm</math>SEM</b>	<b>Signifikanz (<math>p &lt; 0,05</math>)</b>
WT diabetisch/ nicht transplantiert	10	0,36 $\pm$ 0,05	§, #, *,***
WT diabetisch/ transplantiert	19	0,16 $\pm$ 0,07	§, #, **,***
KO diabetisch/ nicht transplantiert	10	2,19 $\pm$ 0,30	§, #,***
KO diabetisch/ transplantiert	9	1,64 $\pm$ 0,17	§, #,***

Tabelle 5.4: Anteil (in %) von Armanni-Ebstein-Läsionen (AEL) am ausgezähltem Nierenparenchym von Wildtyp- (WT) und Knockout- Tieren (KO) nach 3 Monaten Versuchsdauer. N, Tierzahl; AEL, Armanni-Ebstein-Läsionen; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; \$, 3M. gegen 6M.; §, WT gegen KO.

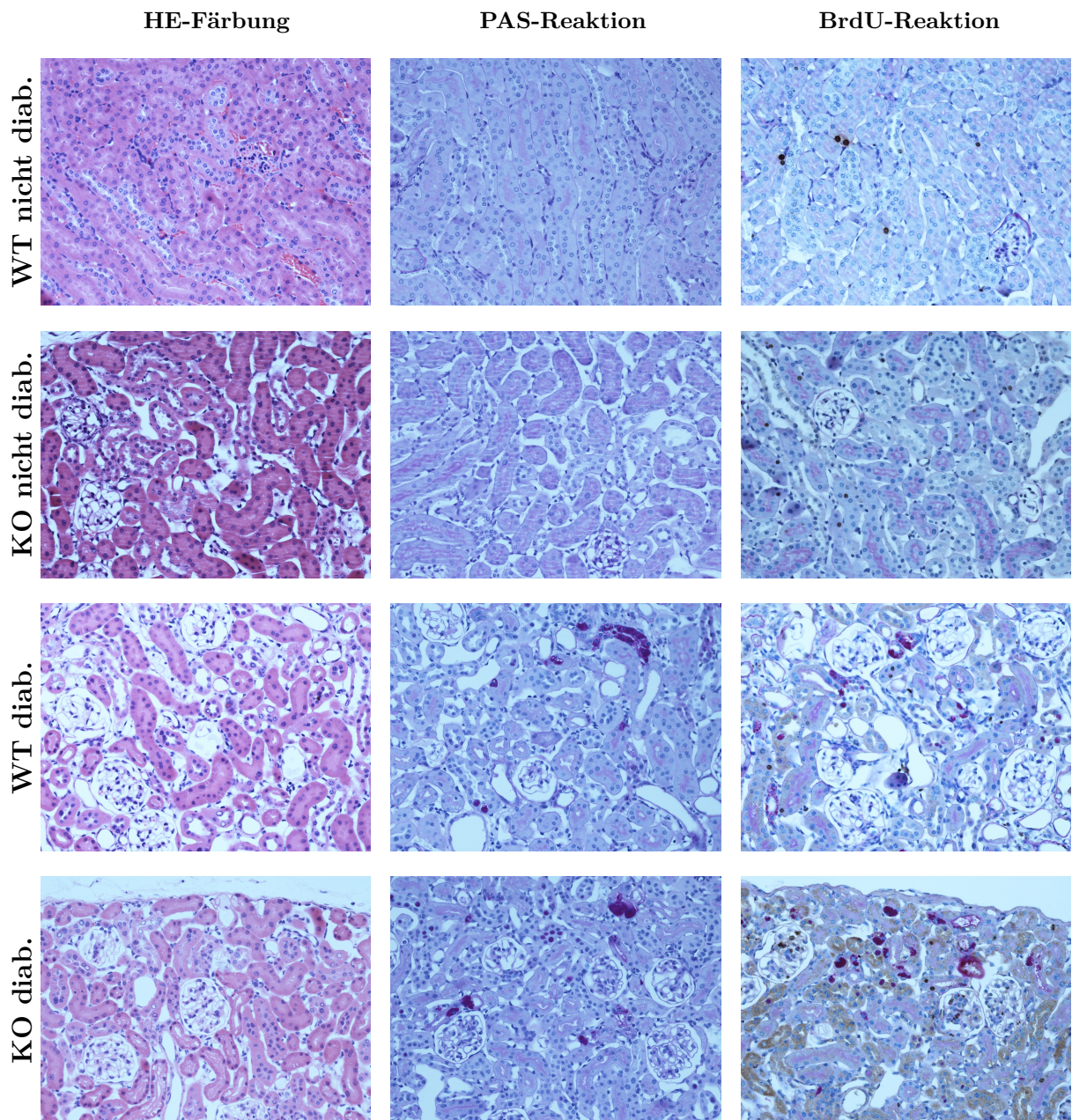


Abbildung 5.1: HE-Färbung, PAS- und BrdU-Reaktion (kombiniert mit PAS) vom Nierenrindenparenchym drei Monate alter Wildtyp- (WT) und ChREBP-Knockout-Tiere (KO). Die diabetischen Mäuse (Zeile 1 und 2) zeigen mehrere glykogenotische Veränderungen (rote Einlagerungen) in Form von GSK (nukleär) und AEL (intrazytoplasmatisch). Diese sind bei nicht diabetischen Tieren (Zeile 3 und 4) nicht zu finden. In den mit BrdU gefärbten Abbildungen (Spalte 3) sind sowohl bei den diabetischen als auch nicht diabetischen Tieren beider Stämme vereinzelt BrdU positive Zellkerne (braun) zu finden. GSK, Glykogenspeicherkerne; AEL, Armanni-Ebstein-Läsionen; diab., diabetisch. Länge untere Bildkante: 0,5 mm.

#### 5.2.4 C57BL/6J-Wildtyp-Stamm nach 6- monatiger Versuchsdauer

**Vorkommen GSK** Nach sechs Monaten treten GSK nur bei diabetischen Tieren innerhalb der distalen Tubuluszellen auf. Deren Vorkommen ist im Bezug aufs Normalgewebe signifikant (diab.:  $p=0,0002362$ ; Tx/diab.:  $p=3,902 \cdot 10^{-7}$ ). Die diabetischen Tiere ohne Transplantation (MW=8,30%  $\pm 0,94$ ) weisen mehr GSK als die zusätzlich transplantierten Tiere (5,31%  $\pm 0,74$ ) auf ( $p=0,02722$ ). Siehe hierzu Abb. 5.2 und Tab. 5.5.

**Vorkommen AEL** Die AEL kommen sowohl bei distalen als auch bei proximalen Tubuli, jedoch nur bei Vorliegen eines Diabetes, vor. Dabei unterscheiden sich die diabetischen Tiere ohne Transplantation (0,39%  $\pm 0,15$ ) nicht von der diabetischen *und* transplantierten Gruppe (0,14%  $\pm 0,03$ ). Bei den Tieren ohne Transplantation entfallen dabei im Mittel 46,10%  $\pm 18,48$  auf das proximale Epithel, während bei der diabetischen *und* transplantierten Gruppe der Anteil bei 69,39%  $\pm 7,05$  liegt. Siehe auch Abb. 5.2 und Tab. 5.6.

#### 5.2.5 ChREBP-Knockout-Stamm nach 6- monatiger Versuchsdauer

**Vorkommen GSK** Nach sechs Monaten kommen GSK bei den Knockout-Tieren nur innerhalb der distalen Tubuluszellen sowie bei Vorliegen eines Diabetes vor. Gegenüber dem Normalgewebe stellt deren Vorkommen einen signifikanten Unterschied dar (diab:  $p=0,0003102$ ; Tx/diab.:  $p=0,0003102$ ). Dabei weist die diabetische Gruppe ohne Transplantation (14,34%  $\pm 1,41$ ) mehr solcher GSK als die diabetischen *und* transplantierten Tiere (8,52%  $\pm 0,55$ ) auf ( $p=0,003063$ ). Siehe hierzu Abb. 5.2 sowie Tab. 5.5.

**Vorkommen AEL** Bei 6-monatigen Knockout-Tieren treten AEL sowohl in proximalen als auch distalen Tubuli auf, allerdings nur bei bestehendem Diabetes. Die diabetischen Mäuse ohne Transplantation (1,67%  $\pm 0,20$ ) zeigen dabei keinen Unterschied zu den diabetischen *und* transplantierten Tieren (1,44%  $\pm 0,10$ ). Der Hauptteil der AEL entfallen auf das proximale Tubulusepithel (diab.: 89,18%  $\pm 4,31$ ; diab./Tx: 91,71%  $\pm 2,75$ ) Die Ergebnisse sind in Tab. 5.6 dargestellt. Siehe auch Abb. 5.2.

#### 5.2.6 Glykogenotische Veränderungen bei C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm nach sechs Monaten im Vergleich

Beide Stämme zeigen nach einer Versuchsdauer von 6 Monaten dass sowohl GSK als auch AEL nur bei diabetischen Tieren auftreten. Außerdem zeigt sich, dass die GSK nur bei den distalen Tubuli und die AEL bei beiden Tubulustypen- wenn auch anders verteilt- vorkommen. Allerdings kann beobachtet werden, dass die diabetischen Knockout-Mäuse mehr GSK aufweisen als die Tiere des Wildtyps ( $p=0,003598$ ). Auch die diabetischen *und* transplantierten Tiere des Knockout-Stammes zeigen ein stärkeres Vorkommen von GSK als der Wildtyp ( $p=0,001493$ ). Vergleiche Tab. 5.5. Außerdem zeigen die diabetischen Wildtyp-Tiere deutlich weniger intrazytoplasmatisches Glykogen als der Knockout-Stamm ( $p=5,459 \cdot 10^{-5}$ ) Auch

die diabetischen *und* transplantierten Mäuse des Wildtyps weisen weniger AEL auf als die entsprechende Knockout-Gruppe ( $p=3,551 \cdot 10^{-5}$ ).Vergleiche Tab. 5.6. Dabei entfällt bei den Kockout-Tieren der Großteil auf die proximalen Tubuli, während beim WT-Stamm auch vermehrt distale Tubuli betroffen sind.

Gruppe	N	GSK (in%) MW $\pm$ SEM	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
WT diabetisch/ nicht transplantiert	6	8,30 $\pm$ 0,94	§, #, *,***
WT diabetisch/ transplantiert	20	5,31 $\pm$ 0,74	§, \$, #, **,***
KO diabetisch/ nicht transplantiert	9	14,34 $\pm$ 1,41	§, \$, #, *,***
KO diabetisch/ transplantiert	9	8,52 $\pm$ 0,55	§, #, **,***

Tabelle 5.5: Vorkommen (in %) von Glykogenspeicherkernen (GSK) im distalem Tubulusepithel nach 6-monatiger Versuchsdauer beim Wildtyp- (WT) und Knockout-Stamm (KO). N, Tierzahl; signifikant ( $p < 0.05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; \$, 3M. gegen 6M.; §, WT gegen KO.

Gruppe	N	AEL (in%) MW $\pm$ SEM	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
WT diabetisch/ nicht transplantiert	6	0,39 $\pm$ 0,15	§,#,***
WT diabetisch/ transplantiert	20	0,14 $\pm$ 0,03	§, #, ***
KO diabetisch/ nicht transplantiert	9	1,67 $\pm$ 0,20	§, #, ***
KO diabetisch/ transplantiert	9	1,44 $\pm$ 0,10	§, #, ***

Tabelle 5.6: Anteil (in %) von Armanni-Ebstein-Läsionen (AEL) am ausgezähltem Nierenparenchym von Wildtyp- (WT) und Knockout- Tieren (KO) nach 6 Monaten Versuchsdauer. N, Tierzahl; signifikant ( $p < 0.05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; \$, 3M. gegen 6M.; §, WT gegen KO.

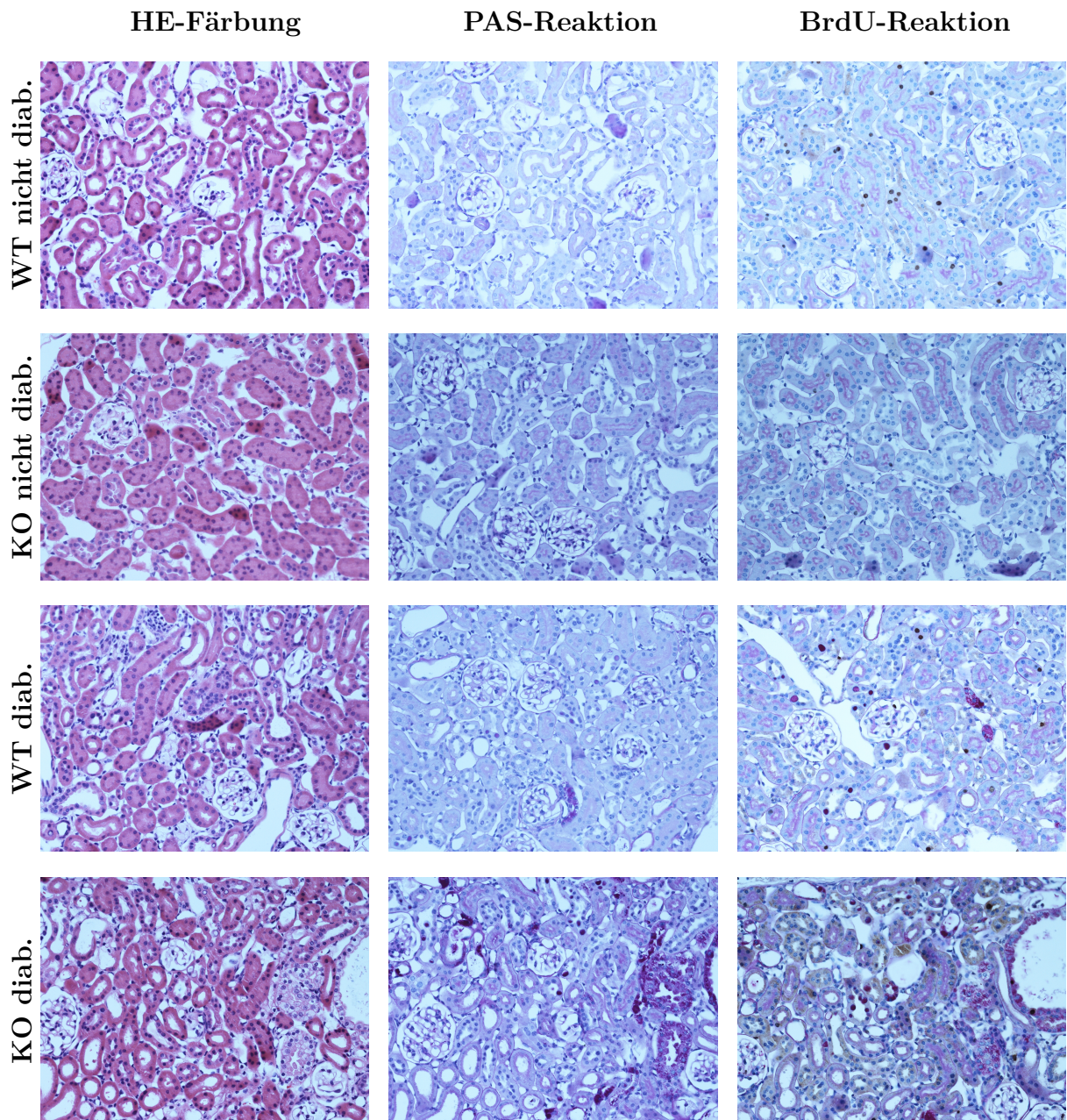


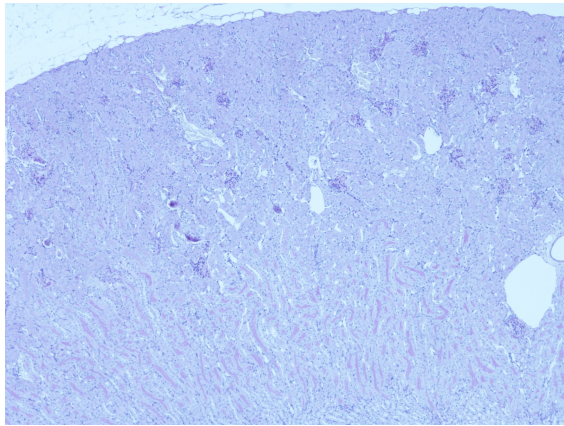
Abbildung 5.2: HE-Färbung, PAS- und BrdU-Reaktion (kombiniert mit PAS) vom Nierenrindenparenchym sechs Monate alter Wildtyp- (WT) und ChREBP-Knockout-Tiere (KO). Die diabetischen Mäuse (Zeile 3 und 4) weisen glykogenotische Veränderungen (rote Einlagerungen) in Form von GSK (nukleär) und AEL (intrazytoplasmatisch) auf, wobei diese stärker beim Knockout-Stamm zu erkennen sind. Diese treten bei nicht diabetischen Tieren (Zeile 1 und 2) nicht auf. In den mit BrdU gefärbten Abbildungen (Spalte 3) sind sowohl bei den diabetischen als auch nicht diabetischen Tieren beider Stämme BrdU positive Zellkerne (braun) zu finden. GSK, Glykogenspeicherkerne; AEL, Armani-Ebstein-Läsionen; diab., diabetisch. Länge untere Bildkante: 0,5 mm.



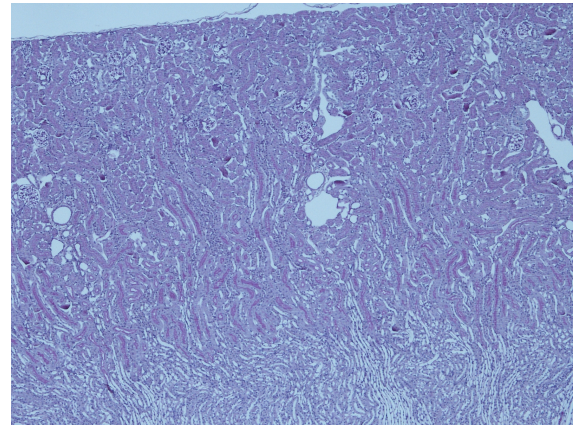
### 5.2.7 Vergleich der unterschiedlichen Versuchszeiträume

**GSK** Hinsichtlich der GSK fällt auf, dass nur distale Tubuli betroffen sind. Insgesamt scheinen sowohl nach drei als auch nach sechs Monaten die diabetischen Tiere stärker betroffen zu sein als Mäuse, die zusätzlich eine Transplantation erhalten haben (s.o). Allerdings zeigen die diabetischen Wildtyp-Tiere nach drei Monaten im Verhältnis zu den 6-monatigen Tieren keinen signifikanten Unterschied. Demgegenüber unterscheiden sich die diabetischen ChREBP-Knockout-Tiere nach drei und sechs Monaten signifikant ( $p=0,04039$ ) voneinander. Die diabetischen *und* transplantierten Tiere des Wildtyps zeigen nach drei Monaten mehr GSK als nach sechs Monaten ( $p=0,01396$ ), während der Knockout-Stamm keinen Unterschied zeigt.

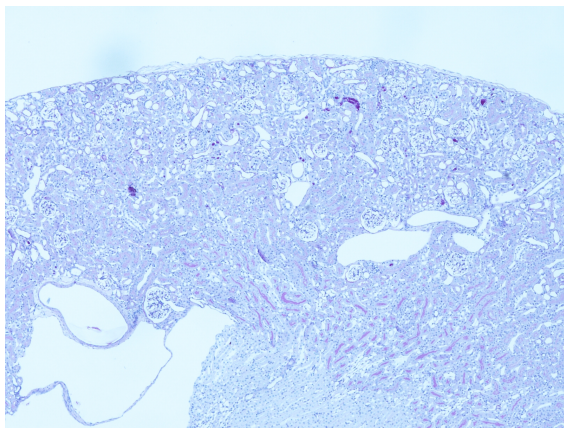
**AEL** Die AEL treten bevorzugt innerhalb beider Versuchszeiträume nur bei diabetischen Tieren auf. Darüber hinaus kommen die AEL unabhängig vom Versuchszeitraum am stärksten bei den diabetischen ChREBP-Knockout-Tieren vor (s.o). Zwischen den diabetischen Wildtyp-Tieren beider Zeiträume lässt sich mit und ohne Transplantation kein signifikanter Unterschied beim Auftreten der AEL feststellen. Auch die Knockout-Tiere unterscheiden sich hierin nach 3 und 6 Monaten nicht voneinander. Im Hinblick auf die tubuläre Verteilung der AEL lässt sich beim Wildtyp ein nicht signifikanter Anstieg zugunsten der distalen Tubuluszellen von drei zu sechs Monaten beobachten, während beim Knockout-Stamm in beiden Versuchszeiträumen in fast gleichem Maße vor allem die proximale Tubuli betroffen sind. Vergleiche hierzu Abb. 5.3.



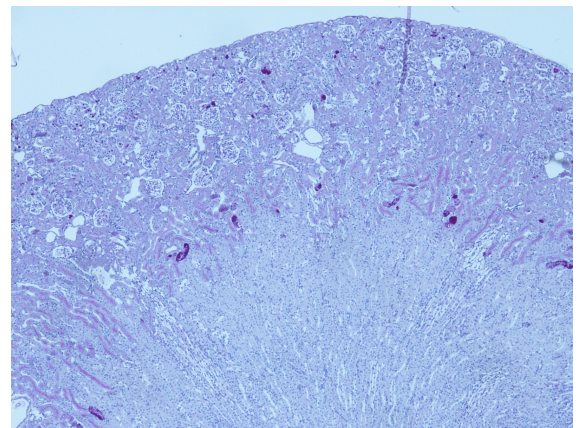
(a) WT nicht diab./nicht Tx 3M



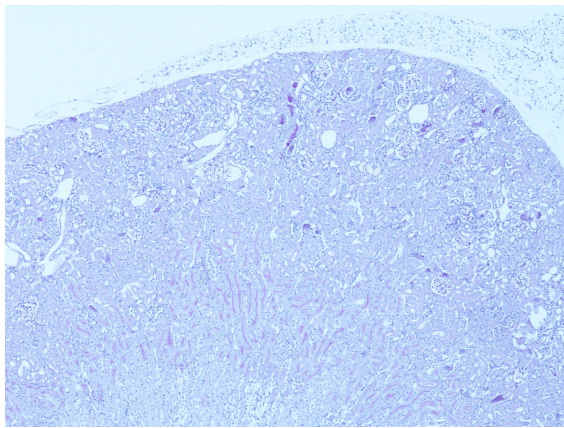
(b) KO nicht diab./nicht Tx 3M



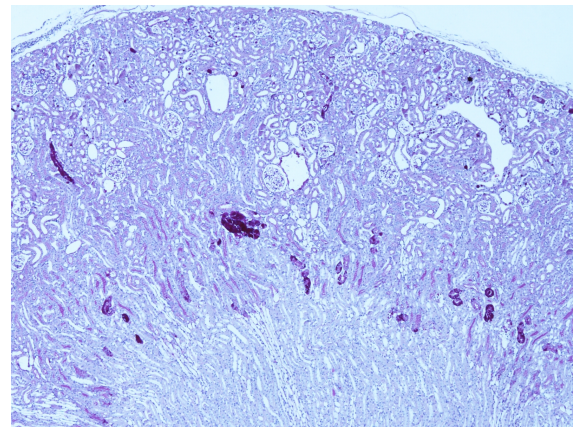
(c) WT diab./nicht Tx 3M



(d) KO diab./nicht Tx 3M



(e) WT diab./nicht Tx 6M



(f) KO diab./nicht Tx 6M

Abbildung 5.3: PAS- Reaktion vom Nierenparenchym von Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Tieren nach drei und sechs Monaten im Vergleich. In der Übersichtsvergrößerung (Länge untere Bildkante= 2,5 mm) ist zu erkennen, dass die nicht diabetischen Tiere beider Stämme (WT=a, KO=b) keine Glykogeneinlagerungen zeigen. Die diabetischen Tiere zeigen dagegen eine vermehrte Akkumulation von AEL, wobei diese insbesondere beim Knockout-Stamm vorkommen (WT=c,e; KO=d,f). Zwischen den unterschiedlichen Versuchszeiträumen (3M=c,d; 6M=e,f) lässt sich kein Unterschied beobachten. WT, Wildtyp; KO, ChREBP-Knockout; Tx, transplantiert; diab., diabetisch.

### 5.3 Proliferationsaktivität des Tubulusepithels

#### 5.3.1 C57BL/6J-Wildtyp-Stamm nach 3-monatiger Versuchsdauer

Die Tubuli der nicht diabetischen Tiere ohne Transplantation weisen mit einem BrdU-LI von  $0,94\% \pm 0,13$  die geringste Proliferationsaktivität (PA) auf, wobei gegenüber allen Gruppen ein signifikanter Unterschied nachweisbar ist (diab.:  $p=0,0499$ , Tx:  $p=0,0003248$ , diab./Tx= $1,019 \cdot 10^{-7}$ ). Dagegen unterscheidet sich der BrdU-LI vom Tubulusepithel der diabetischen Tiere sowohl ohne ( $2,35\% \pm 0,65$ ) als auch mit Transplantation ( $4,56\% \pm 0,47$ ) nicht von der PA der Tubuli der transplantierten, nicht diabetischen Tiere ( $3,54\% \pm 1,04$ ). Insgesamt proliferiert damit das Tubulusepithel der diabetischen Tiere gegenüber dem der nicht diabetischen Mäuse, die keine Tx erhalten haben, stärker. Innerhalb der diabetischen Mäuse proliferiert das Tubulusepithel der diabetischen *und* transplantierten Mäuse stärker als das der diabetischen, nicht transplantierten Tiere ( $p=0,01228$ ). Siehe hierzu Abb. 5.1 sowie Tab. 5.7. Betrachtet man die tubuläre Verteilung der BrdU positiven Zellkerne, so fällt auf, dass je nach Versuchsgruppe zwischen  $84,33\% \pm 2,79$  (TX/diabetisch) und  $91,85\% \pm 2,72$  (diabetisch) auf die proximale Tubuli entfallen.

#### 5.3.2 ChREBP-Knockout-Stamm nach 3-monatiger Versuchsdauer

Bei den nicht diabetischen, nicht transplantierten ChREBP-Knockout Mäusen liegt der BrdU-LI des Tubulusepithels mit  $1,79\% \pm 0,32$  am niedrigsten, wobei er sich gegenüber allen Gruppen mit Ausnahme der diabetischen signifikant unterscheidet (Tx:  $p=0,00341$ , diab./Tx:  $p=0,00278$ ). Die Tubuli der nicht diabetischen, transplantierten Tiere ( $6,12\% \pm 1,02$ ) zeigen eine höhere PA als die der diabetischen Tiere ( $2,69\% \pm 0,46$ ) ohne Transplantation ( $p=0,01235$ ), hingegen sich gegenüber der diabetischen *und* transplantierten Gruppe ( $4,69\% \pm 0,68$ ) kein Unterschied feststellen lässt. Somit proliferieren die Tubuli der diabetischen und die der nicht diabetischen Tiere ohne und mit Tx im Bezug auf ihre jeweilige Vergleichsgruppe ähnlich stark. Innerhalb der diabetischen Tiere zeigt das Tubulusepithel der diabetischen *und* transplantierten Mäuse eine höhere PA auf als das der diabetischen Tiere ohne Tx ( $p=0,02823$ ). Vergleiche hierzu Abb. 5.1 und Tab. 5.8.

Im Hinblick auf die Verteilung der BrdU positiven Zellkerne kann beobachtet werden, dass zwischen  $77,31\% \pm 2,62$  (transplantiert) und  $88,67\% \pm 5,79$  (diabetisch) innerhalb des proximalen Tubulusepithels lokalisiert sind.

#### 5.3.3 Vergleich der Proliferationsaktivitäten von Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäusen nach drei Monaten

Vergleicht man beide Tierstämme miteinander, so fällt auf, dass die Tubuli der nicht diabetischen, nicht transplantierten Wildtyp-Tiere einen geringeren BrdU-LI als die Tubuli des Knockout-Stammes aufweisen ( $p=0,01924$ ). Das Tubulusepithel der nicht diabetischen Wildtyp-Tiere mit Transplantation haben dagegen eine stärkere PA als die Tubuli der ent-

sprechenden Knockout-Tiere ( $p=0,01166$ ). Die diabetischen Mäuse mit und ohne Transplantation beider Stämme unterscheiden sich dagegen nicht voneinander. Auch zwischen den Gruppen des jeweiligen Stammes mit der stärksten PA (WT=Tx; KO=diab./Tx) lässt sich kein Unterschied feststellen. Der Großteil der BrdU positiven Zellkerne ist bei beiden Stämmen im proximalen Tubulusepithel lokalisiert. Bemerkenswert ist, dass der Anteil der distalen Tubuli bei den nicht diabetischen, nicht transplantierten Knockout-Mäusen größer ist als beim Wildtyp ( $p= 0,03359$ ). Bei den anderen Gruppen lässt sich kein Unterschied feststellen.

Gruppe	N	BrdU-LI (in %) MW $\pm$ SEM	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
WT nicht diabetisch/ nicht transplantiert	10	0,94 $\pm$ 0,13	§ \$, *, **, ***
WT diabetisch/ nicht transplantiert	10	2,35 $\pm$ 0,65	#, *
WT nicht diabetisch/ transplantiert	10	3,54 $\pm$ 1,04	§, #
WT diabetisch/ transplantiert	19	4,56 $\pm$ 0,47	#, **

Tabelle 5.7: Proliferationsaktivität anhand vom BrdU-LI (in %) des renalen Tubulusepithels bei Wildtyp-Tieren (WT) nach 3-monatiger Versuchsdauer. N, Tierzahl.; BrdU-LI, BrdU-Labeling-Index; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; \$, 3M. gegen 6M.; §, Wildtyp gegen Knockout

Gruppe	N	BrdU-LI (in %) MW $\pm$ SEM	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
KO nicht diabetisch/ nicht transplantiert	10	1,79 $\pm$ 0,32	§, \$, *, ***,
KO diabetisch/ nicht transplantiert	10	2,69 $\pm$ 0,46	*, ***,
KO nicht diabetisch/ transplantiert	8	6,12 $\pm$ 1,02	§, \$, **
KO diabetisch/ transplantiert	9	4,69 $\pm$ 0,68	#, **

Tabelle 5.8: Proliferationsaktivität anhand vom BrdU-LI (in %) des renalen Tubulusepithels bei Knockout-Tieren (KO) nach 3 Monaten Versuchsdauer. N, Tierzahl.; BrdU-LI, BrdU-Labeling-Index; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; \$, 3M. gegen 6M.; §, Wildtyp gegen Knockout

### 5.3.4 C57BL/6J-Wildtyp-Stamm nach 6-monatiger Versuchsdauer

Nach sechs Monaten weisen die nicht diabetischen, nicht transplantierten Tiere ( $3,16\% \pm 0,38$ ) einen ähnlichen BrdU-LI wie die nicht diabetische, transplantierte Gruppe ( $2,86\% \pm 0,38$ ) auf. Das Tubulusepithel beider Gruppen weist gegenüber den diabetischen Mäusen ohne ( $2,24\% \pm 0,24$ ) und mit Transplantation ( $3,64\% \pm 0,23$ ) keinen Unterschied hinsichtlich der PA auf. Damit proliferieren die diabetischen im Vergleich zu den nicht diabetischen Tieren unabhängig von einer durchgeführten Transplantation ähnlich stark. Ein signifikanter Unterschied lässt sich nur zwischen der PA des Tubulusepithels von diabetischen Tieren ohne Transplantation gegenüber dem Tubulusepithel der diabetischen *und* transplantierten Gruppe nachweisen ( $p = 0,0006272$ ). Siehe hierzu Abb. 5.2 und Tab. 5.9.

Für die Verteilung der BrdU-positiven Zellkerne ergibt sich, dass zwischen  $84,03\% \pm 2,10$  (diab./Tx) und  $96,17\% \pm 1,81$  (nicht diab./nicht Tx) auf die proximalen Tubuluszellen entfallen.

### 5.3.5 ChREBP-Knockout-Stamm nach 6-monatiger Versuchsdauer

Die Tubuli der nicht diabetischen, nicht transplantierten Knockout-Mäuse ( $2,23\% \pm 0,56$ ) weisen nach sechs Monaten eine ähnliche PA wie die nicht diabetische, transplantierte ( $3,43\% \pm 0,36$ ) sowie diabetische Gruppe ( $2,07\% \pm 0,37$ ) auf. Deren Tubuli Letztere besitzt einen kleineren BrdU-LI als die nicht diabetischen, transplantierten Tiere ( $p = 0,017$ ). Das Tubulusepithel der diabetischen *und* transplantierten Tiere ( $3,95\% \pm 0,41$ ) zeigt gegenüber den diabetischen und nicht diabetischen Mäusen ohne Transplantation eine erhöhte PA (diab.:  $p = 0,005422$ , nicht diab./nicht Tx:  $p = 0,03037$ ). Gegenüber der nicht diabetischen, transplantierten Gruppe besteht dagegen kein Unterschied. Insgesamt proliferieren damit die nicht diabetischen und diabetischen Tiere im Bezug auf ihre jeweilige Vergleichsgruppe ähnlich stark. Vergleiche dazu Abb. 5.2 sowie Tab. 5.10.

Der Hauptteil der BrdU positiven Zellkerne ist dem proximalen Tubulusepithel zuzuordnen, wobei zwischen  $61,58\% \pm 8,91$  (diabetisch) und  $97,00\% \pm 1,46$  (nicht diab./nicht Tx) auf dieses entfällt.

### 5.3.6 Vergleich der Proliferationsaktivitäten vom C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP- Knockout-Mäusen nach sechs Monaten

Es lässt sich in keiner Gruppe ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der PA des Tubulusepithels zwischen Wildtyp und Knockout-Stamm nachweisen. Vergleiche hierzu Abb. 5.9 und 5.10. Hinsichtlich der Verteilung der BrdU positiven Zellkerne auf das distale bzw. proximale Tubulusepithel lässt sich feststellen, dass sich in beiden Fällen der größte Teil auf die proximalen Tubuli erstreckt, wobei die diabetischen Knockout-Tiere ( $38,42\% \pm 8,91$ ) mehr distale Zellkerne als der Wildtyp ( $8,09\% \pm 2,48$ ) aufweisen. Innerhalb der anderen Gruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Gruppe	N	BrdU-LI (in %) MW $\pm$ SEM	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
WT nicht diabetisch/ nicht transplantiert	10	3,16 $\pm$ 0,38	\$
WT diabetisch/ nicht transplantiert	6	2,24 $\pm$ 0,24	*
WT nicht diabetisch/ transplantiert	10	2,86 $\pm$ 0,38	—
WT diabetisch/ transplantiert	20	3,64 $\pm$ 0,23	**

Tabelle 5.9: Proliferationsaktivität anhand vom BrdU-LI (in %) des renalen Tubulusepithels bei Wildtyp-Tieren (WT) nach 6-monatiger Versuchsdauer. N, Tierzahl.; BrdU-LI, BrdU-Labeling-Index; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*,transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; \$, 3M. gegen 6M.; §, Wildtyp gegen Knockout

Gruppe	N	BrdU-LI (in %) MW $\pm$ SEM	Signifikanz ( $p < 0,05$ )
KO nicht diabetisch/ nicht transplantiert	8	2,23 $\pm$ 0,56	\$, *
KO diabetisch/ nicht transplantiert	9	2,07 $\pm$ 0,37	*, ***
KO nicht diabetisch/ transplantiert	10	3,43 $\pm$ 0,36	\$, **
KO diabetisch/ transplantiert	9	3,95 $\pm$ 0,41	#, **

Tabelle 5.10: Proliferationsaktivität anhand vom BrdU-LI (in %) des renalen Tubulusepithels bei Knockout-Tieren (KO) nach 6 Monaten Versuchsdauer. N, Tierzahl.; BrdU-LI, BrdU-Labeling-Index; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; \$, 3M. gegen 6M.; §, Wildtyp gegen Knockout

### 5.3.7 Vergleich der unterschiedlichen Versuchszeiträume

**Wildtyp** Im Hinblick auf die Proliferationsaktivität des Wildtyps fällt auf, dass die Tubuli der nicht diabetischen, nicht transplantierten Tiere nach 3-monatiger Versuchsdauer weniger BrdU-positive Zellkerne als nach sechs Monaten aufweisen ( $p=0,0002917$ ). Das Tubulusepithel der nicht diabetischen Tiere mit Transplantation zeigt nach 3 und 6 Monaten ebenso wie die diabetischen Tiere mit und ohne Transplantation keine unterschiedliche PA auf. Der größte Teil der BrdU positiven Zellkerne entfällt sowohl nach drei als auch sechs Monaten auf das proximale Tubulusepithel, wobei sich für die einzelnen Gruppen keine signifikante Unterschiede für deren prozentuale Anteile ergeben.

**ChREBP-Knockout** Vergleicht man den BrdU-LI des Tubulusepithels vom ChREBP-Knockout-Stamm nach drei und sechs Monaten, so zeigt sich, dass die Tubuli der nicht diabetischen, nicht transplantierten Tiere nach sechs Monaten eine stärkere PA als nach drei Monaten zeigen ( $p=0,0003058$ ). Die Tubuli der transplantierten Tiere ohne Diabetes zeigen dagegen nach sechs Monaten einen kleineren BrdU-LI als innerhalb der drei-monatigen Vergleichsgruppe ( $p=0,03606$ ). Bei den diabetischen Tieren mit und ohne Transplantation lässt sich kein Unterschied zwischen den Versuchszeiträumen nachweisen. Sowohl nach drei als auch sechs Monaten ist der Hauptteil der BrdU positiven Zellkerne im proximalen Tubulusepithel lokalisiert. Dabei weisen nur die diabetischen Tiere nach drei Monaten einen größeren proximalen Anteil auf als nach sechs Monaten ( $p=0,01686$ ), während sich bei den anderen Gruppen keine signifikante Unterschiede ergeben.

## 5.4 Nierentumoren

### 5.4.1 Morphologie

**Nierentumoren beim Wildtyp** Beim Wildtyp zeichneten sich die Tumoren häufig durch ein zystisches Wachstum aus, die sich relativ scharf zum umliegenden Nierengewebe abgrenzen ließ. Meistens handelte es sich zudem um kleine Tumorherde (Größe  $> 1,00$  mm, MW=1,78 mm), sodass bei den Wildtyp-Tieren vor allem Adenome vorkamen. Zum Teil wiesen die Tumoren papilläre Muster auf. Die Tumorzellen hatten ein blass basophiles Zytoplasma. In der PAS-Reaktion bzw. BrdU-Reaktion ließen sich keine bis leichte Glykogen-einlagerungen und einige BrdU-positive Zellkerne, also eine leicht gesteigerte Proliferationsaktivität, nachweisen. Ein solches Adenom ist beispielhaft in Abb. 5.5 gezeigt.

**Nierentumoren beim ChREBP-Knockout-Stamm** Beim ChREBP-Knockout-Stamm wiesen die Tumoren größere Unterschiede auf. Zum Einen ließen sich kleinere, zystische Tumoren (Größe  $> 1,00$  mm, MW= 2,06 mm) im Sinne eines Adenoms mit zum Teil tubulärem Wachstum beobachten, das sich noch relativ gut zum umliegenden Nierengewebe abgrenzen ließ. Allerdings wiesen manche dieser Tumoren bereits ein infiltratives Wachstum ins umliegende Nierengewebe auf, sodass es sich bei diesen bereits um Karzinome handelte. Die Tumorzellen verfügten über ein schwach basophiles und teilweise vakuolisiertes Zytoplasma auf, während ihre Zellkerne zum Teil vergrößert und hyperchromatisch erschienen. Ein Beispiel ist in Abb. 5.4 dargestellt.

Zum anderen traten große, stark invasiv und destruierend wachsende Karzinome (Größe  $> 3,00$  mm, MW=4,24) auf, die das umliegende Nierenparenchym bereits in weiten Teilen zerstört hatten. Diese Karzinome zeigten solide, aber auch tubulär wachsende Anteile auf. Die Tumorzellen waren pleomorph und wiesen starke Atypien auf. Exemplarisch ist ein solcher Tumor in Abb. 5.6 dargestellt. Eine Glykogenspeicherung fehlte in beiden Fällen oder ließ sich nur in geringem Maße nachweisen. Zudem zeigten sich vermehrt BrdU positive Zellkerne (braun) innerhalb der Tumoren.

### 5.4.2 Auftreten beim C57BL/6J-Wildtyp nach drei Monaten

Während des drei monatigen Versuchszeitraums können beim Wildtyp-Stamm keine Nierentumoren beobachtet werden.

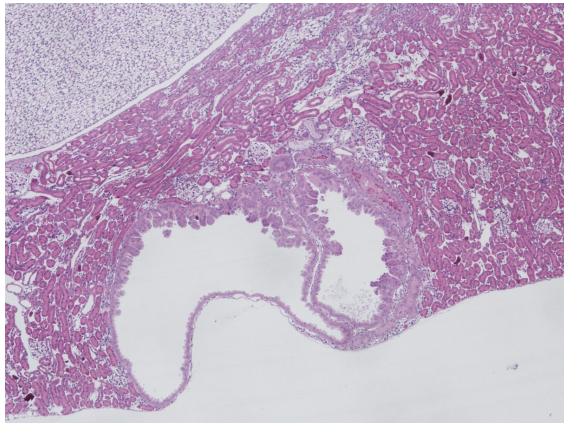
### 5.4.3 Auftreten beim ChREBP-Knockout-Stamm nach drei Monaten

Ingesamt sind bei den ChREBP-Knockout-Tieren nach drei Monaten bei 11,63% der Mäuse renale Tumoren entstanden. Dabei sind mit Ausnahme der transplantierten *und* diabetischen Tiere alle Versuchsgruppen betroffen. Bei den nicht diabetischen, nicht transplantierten Tieren sind 21,05% betroffen, während innerhalb der nicht diabetischen, transplantierten Gruppe 11,76% der Tiere Nierentumoren zeigen. Bei den diabetischen Tieren ohne Transplantation haben 13,3% einen renalen Tumor. Zwischen diesen Gruppen lässt sich jedoch kein Unterschied feststellen. Nur zwischen der nicht diabetischen, nicht transplantierten und der diabetischen *und* transplantierten Gruppe lässt sich zeigen, dass erstere mehr Tumoren aufweist ( $p=0,03474$ ). Siehe dazu Tab. 5.11.

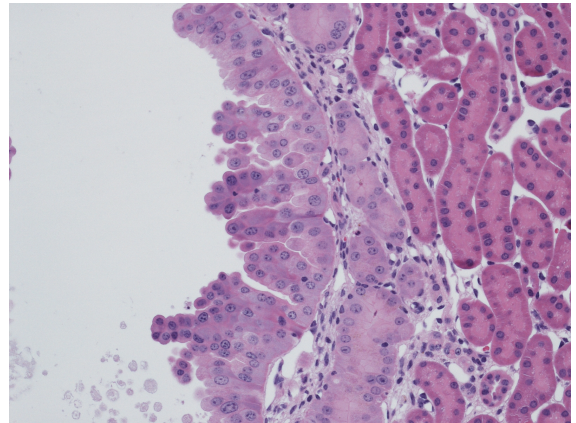
Gruppe	Auftreten von Tumoren/ N	Häufigkeit (in %)	Signifikanz ( $p < 0.05$ )
nicht diabetisch/ nicht transplantiert	4 / 19	21.05 %	§, *
diabetisch/ nicht transplantiert	4 / 30	13.3 %	—
nicht diabetisch/ transplantiert	2 / 17	11.76 %	—
diabetisch/ transplantiert	0 / 20	—	#
Gesamt	10 / 86	11.63 %	§

Tabelle 5.11: Auftreten von Nierentumoren bei ChREBP-Knockout Tieren nach 3 Monaten. N, Tierzahl; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; §, 3M. gegen 6M.; §, Wildtyp gegen Knockout.

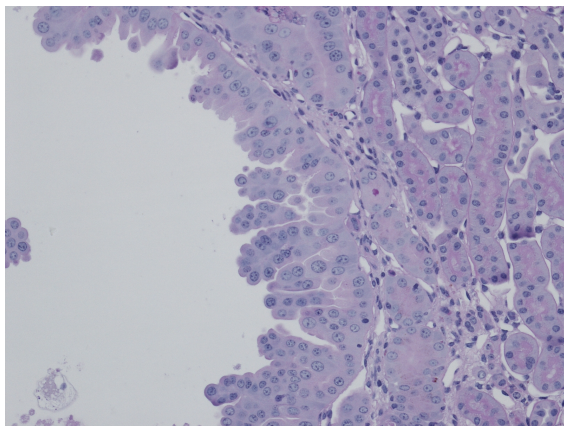




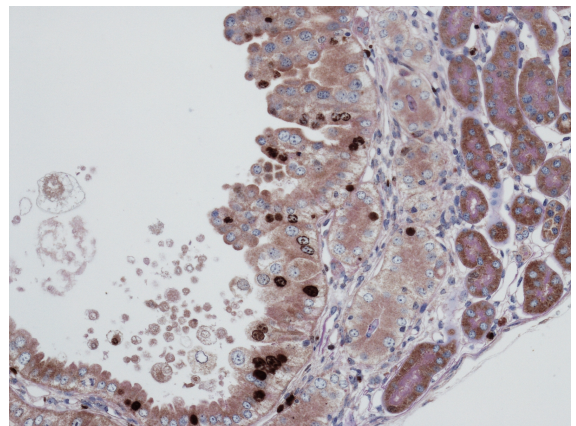
(a) HE-Färbung



(b) HE-Färbung



(c) PAS-Reaktion



(d) BrdU-Reaktion

Abbildung 5.4: HE-Färbung, PAS- und BrdU-Reaktion von einem Nierentumor eines nicht diabetischen, nicht transplantierten ChREBP-Knockout-Tieres nach drei Monaten Versuchsdauer. Zu sehen ist ein zystischer Tumor mit zum Teil tubulärem Wachstum, der sich noch relativ gut zum umliegenden Nierengewebe abzugrenzen scheint (a). Allerdings lässt sich ein beginnendes infiltratives Wachstum der Tumorzellen beobachten (b-d). Die pleomorphen Tumorzellen zeigen vergrößerte, aufgelockerte Zellkerne und haben ein schwach basophiles Zytoplasma (b). Glykogeneinlagerungen finden sich nicht (c). Innerhalb des Tumors treten vermehrt BrdU-positive Zellkerne (braun) auf (d). Länge der unteren Bildkante: (a) 2,5 mm, (b)-(d) 0,5 mm.

#### 5.4.4 Vergleich zwischen dem C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm nach drei Monaten

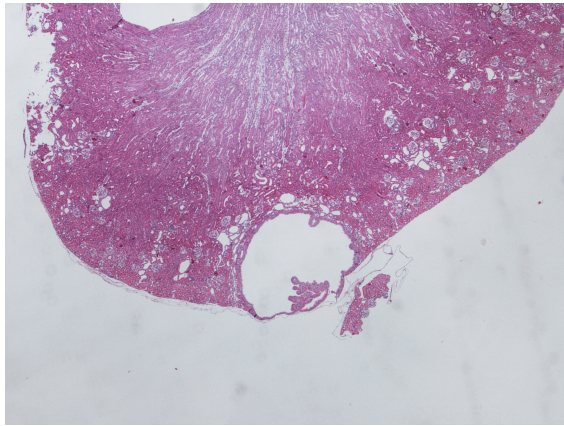
Vergleicht man das Auftreten von Nierentumoren zwischen beiden Tierstämmen, so weisen die ChREBP-KO-Tiere (11,63%) signifikant mehr Nierentumoren als der Wildtyp (0%) auf ( $p=0,0003709$ ). Im Einzelnen zeigen nur die nicht diabetischen, nicht transplantierten Mäuse des Knockout-Stammes mehr Tumoren als die entsprechende Wildtyp-Gruppe ( $p=0,03474$ ). Für die anderen Gruppen ergeben sich zwischen Wildtyp und Knockout keine Unterschiede. Vergleiche Tab. 5.11.

#### 5.4.5 Auftreten beim C57BL/6J-Wildtyp nach sechs Monaten

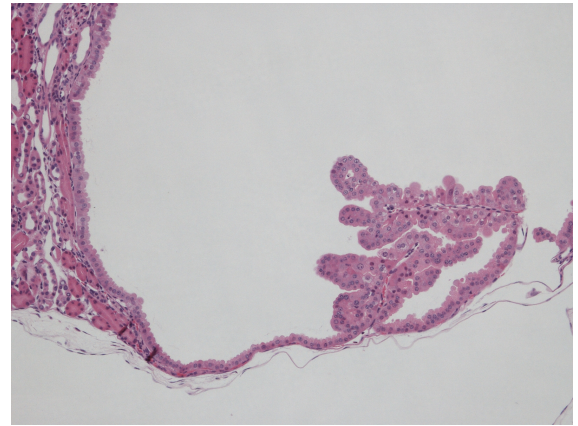
Nach 6-monatiger Versuchsdauer kommen beim Wildtyp insgesamt bei 3,12% der Tiere Nierentumoren vor, wobei sich deren Vorkommen nur auf die diabetische Tiere ohne Transplantation beschränkt. Innerhalb dieser Gruppe sind 14,29% der Mäuse betroffen. Im Vergleich zu den anderen Gruppen ist nur ein Unterschied zu den diabetischen *und* transplantierten Tieren festzustellen ( $p=0,02214$ ). Siehe hierzu Tab. 5.12. Exemplarisch ist ein solch aufgetretener Nierentumor in Abb. 5.5 dargestellt.

Gruppe	Auftreten von Tumoren/ N	Häufigkeit (in %)	Signifikanz ( $p < 0.05$ )
nicht diabetisch/ nicht transplantiert	0 / 19	—	§
diabetisch/ nicht transplantiert	3 / 21	14,29 %	*
nicht diabetisch/ transplantiert	0 / 20	—	—
diabetisch/ transplantiert	0 / 36	—	**
Gesamt	3/ 96	3,13 %	§

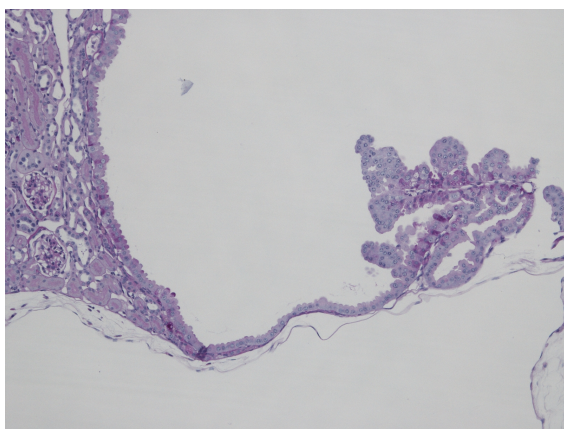
Tabelle 5.12: Auftreten von Nierentumoren beim Wildtyp nach 6 Monaten. N, Tierzahl; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/ transplantiert; \*\*, diabetisch.; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/ nicht transplantiert; §, 3M. gegen 6M.; §, Wildtyp gegen Knockout.



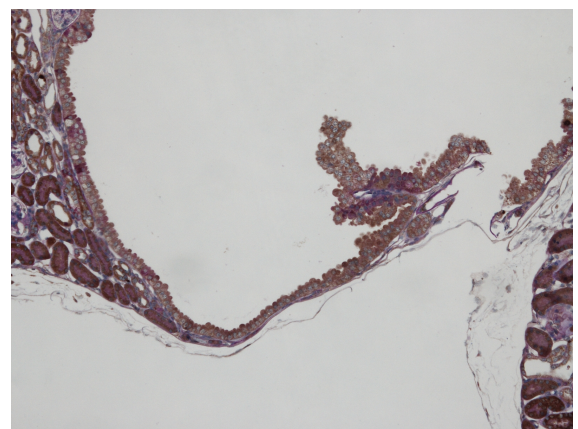
(a) HE-Färbung



(b) HE-Färbung



(c) PAS-Reaktion



(d) BrdU-Reaktion

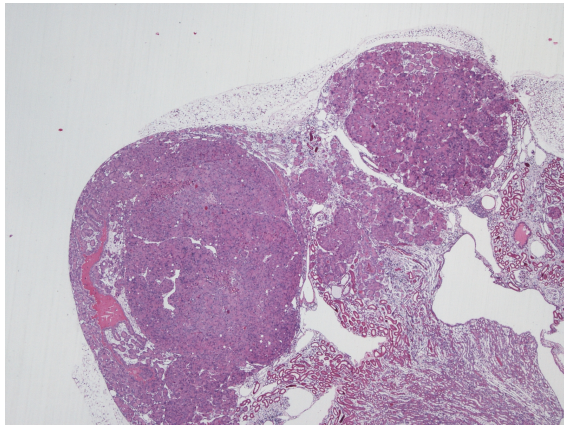
Abbildung 5.5: HE-Färbung, PAS- und BrdU-Reaktion von einem Nierentumor eines diabetischen Wildtyp-Tieres nach sechs Monaten. Zu sehen ist ein kleinerer, zystischer Tumor mit relativ scharfer Begrenzung zum umliegenden Nierengewebe (a). Die Tumorzellen sind pallisadenartig geformt und besitzen ein blass basophiles, tlw. vakuoläres Zytoplasma (b) mit leichten Glykogeneinlagerungen (rot, c). Es lassen sich kaum BrdU-positive Zellkerne im Tumorgewebe nachweisen (d). Zum Teil zeigt der Tumor neben seinem zystischem Wachstum auch einen Abschnitt mit papillären Wachstum (b-d). Länge untere Bildkante: (a) 5 mm, (b)-(d) 1 mm.

#### 5.4.6 Auftreten beim ChREBP-Knockout-Stamm nach sechs Monaten

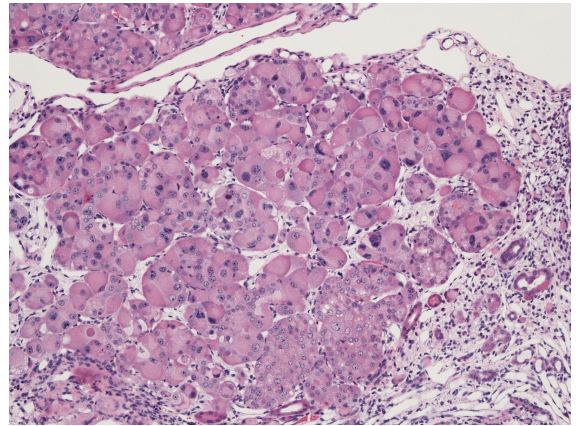
Insgesamt sind bei 11,84% der Knockout-Mäuse Nierentumoren entstanden. Einzeln betrachtet kommen bei den nicht diabetischen, nicht transplantierten Tieren mit 41,18% mehr Tumoren als in den anderen Gruppen vor (diab.:  $p=0,001419$  , Tx:  $p=0,009152$  , diab./Tx:  $p=0,01431$ ) fällt auf. Innerhalb der nicht diabetischen, nicht transplantierten Gruppe weisen 5% der Tiere einen Tumor auf, während bei den diabetischen Tieren nach sechs Monaten keine Tumoren auftreten. Bei der diabetischen *und* transplantierten Gruppe sind bei 5,56% der Mäuse Tumoren entstanden. Unterschiede lassen sich bei diesen drei Gruppen untereinander allerdings nicht feststellen. Siehe Tab. 5.13. Ein solch aufgetretener Tumor zeigt exemplarisch Abb. 5.6.

Gruppe	Auftreten von Tumoren/ N	Häufigkeit (in %)	Signifikanz
nicht diabetisch/ nicht transplantiert	7 / 17	41,18 %	*, **, ***, §
diabetisch/ nicht transplantiert	0 / 21	—	#
nicht diabetisch/ transplantiert	1/ 20	5,00 %	#
diabetisch/ transplantiert	1 / 18	5,56 %	#
Gesamt	9 / 76	11,84 %	§

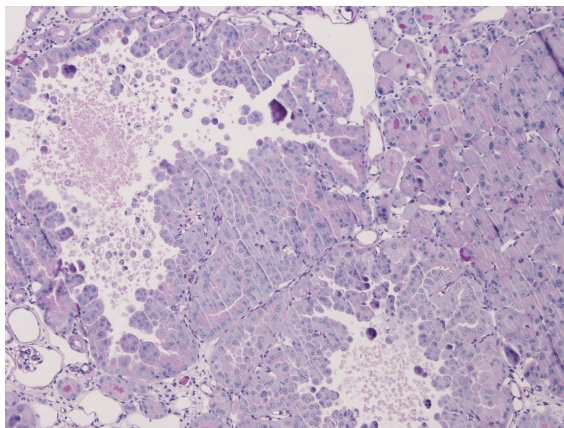
Tabelle 5.13: Auftreten von Nierentumoren bei ChREBP-Knockout Tieren nach 6 Monaten. N, Tierzahl; signifikant ( $p < 0,05$ ) gegen \*, diabetisch/transplantiert; \*\*, diabetisch; \*\*\*, transplantiert; #, nicht diabetisch/nicht transplantiert; §, 3M. gegen 6M.; §, Wildtyp gegen Knockout.



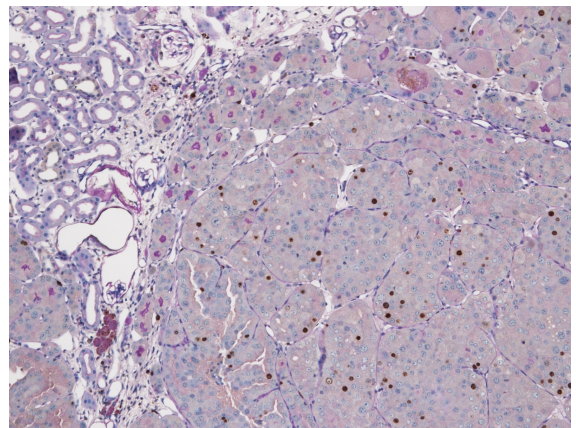
(a) HE-Färbung



(b) HE-Färbung



(c) PAS-Reaktion



(d) BrdU-Reaktion

Abbildung 5.6: HE-Färbung, PAS- und BrdU-Reaktion von einem Nierentumor eines nicht diabetischen, nicht transplantierten ChREBP-Knockout-Tieres nach sechs Monaten. Zu sehen ist ein großer, invasiv und destruierend wachsender Tumor, der das Nierenparenchym weitgehend zerstört hat (a). Die Tumorzellen sind durch einen Differenzierungsverlust mit starken Atypien gekennzeichnet. Sie besitzen ein blass basophiles, tlw. vakuoläres Zytoplasma (b) ohne Glykogeneinlagerungen (c). Zudem zeigen sich vermehrt BrdU positive Zellekerne (braun) innerhalb des Tumors (d). Abschnitte des Tumors zeigen neben einem solidem (a,d) auch ein tubuläres Wachstum (c). Länge untere Bildkante: (a) 5 mm, (b)-(d) 1 mm

#### 5.4.7 Vergleich zwischen dem C57BL/6J-Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Stamm nach sechs Monaten

Im Bezug auf das gesamte Auftreten von Nierentumoren zwischen den beiden Tierstämmen zeigen die Knockout-Tiere nach sechs Monaten mehr renale Tumoren als der Wildtyp ( $p=0,02651$ ). Außerdem zeigt sich, dass Nierentumoren beim Wildtyp nur innerhalb der diabetischen Gruppe auftreten, während bei den Knockout-Tieren solche in fast allen Gruppen (ausgen. diabetisch) vorkommen. Allerdings zeigen im Einzelnen nur die nicht diabetischen, nicht transplantierten Knockout-Mäuse gegenüber dem Wildtyp mehr Tumoren ( $p=0,002291$ ). Für die anderen Gruppen des Knockout und Wildtyps lassen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Vergleiche hierzu Tab. 5.12 und 5.13.

#### 5.4.8 Vergleich zwischen den unterschiedlichen Versuchszeiträumen

**Wildtyp** Im Vergleich zwischen drei und sechs Monaten ist festzustellen, dass nach drei Monaten keine und nach sechs Monaten bei 3,12% der Wildtyp-Tiere Nierentumoren entstanden sind. Allerdings lässt sich zwischen den beiden Zeiträumen kein Unterschied nachweisen.

**ChREBP-KO** Innerhalb des Knockout-Stammes treten nach drei Monaten insgesamt ähnlich viele renale Tumoren auf wie nach sechs Monaten. Die meisten Nierentumoren entfallen sowohl nach drei als auch nach sechs Monaten auf die Gruppe der diabetischen, nicht transplantierten Tiere, wobei sich beide Zeiträume nicht signifikant voneinander unterscheiden. Auch die anderen Gruppen des Knockout-Stammes zeigen keine Unterschiede im Auftreten von Tumoren zwischen den beiden Versuchszeiträumen.

## 6 Ergebnisdiskussion

**tubuläre Glykogenspeicherung** Hinsichtlich der Akkumulation von Glykogen in den renalen Tubulusepithelien fällt auf, dass diabetische ChREBP-Knockout-Tiere mit und ohne Transplantation sowohl nach drei als auch nach sechs Monaten mehr GSK und AEL aufweisen als die diabetischen Wildtyp-Tiere. Damit trägt das Ausschalten des Transkriptionsfaktors ChREBP maßgeblich zur Entstehung von glykogenotischen Veränderungen bei. Eine Grundvoraussetzung ist das Vorliegen eines Diabetes mellitus, da ohne einen solchen die alleinige Inhibition von ChREBP zu keinerlei GSK- und AEL-Bildung führt. Eine mögliche Erklärung für das stärkere Vorkommen von glykogenotischen Veränderungen beim Knockout-Stamm könnte sein, dass diabetische ChREBP-Knockout-Tiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eine stärker ausgeprägte Hyperglykämie aufweisen und es infolge des höheren systemischen Blutzuckerspiegels in den renalen Tubuli zu einer erhöhten Glykogenakkumulation kommt. Tatsächlich zeigen Knockout-Tiere innerhalb der 3M- Versuchsgruppe mit Diabetes im Mittel einen höheren Blutzucker als die Tiere des Wildtyp-Stammes, sowohl mit als auch ohne durchgeführte Transplantation. In Bezug auf die 6M-Versuchsgruppe weisen die transplantierten *und* diabetischen Knockout-Mäuse ebenfalls einen höheren Blutzucker auf. Allerdings gilt dies nicht für die diabetischen, nicht transplantierten Tiere nach sechs monatiger Versuchsdauer. Hier weisen die Wildtyp-Tiere einen höheren Blutzucker auf als der Knockout-Stamm. Ein Grund könnte dafür darstellen, dass viele Tiere des Knockout-Stammes zum Versuchsende aufgrund ihres schlechten Allgemeinzustandes eine Insulintherapie durch Insulinstick-Implantation (siehe 4.4.1) erhalten haben und so der mittlere Blutzucker therapiebedingt niedriger erscheint. In diesem Zusammenhang könnte die größere Notwendigkeit einer Insulintherapie bei den Knockout-Tieren als Indiz für einen sich stärker manifestierenden Diabetes interpretiert werden. Für eine schwerere Manifestation des Diabetes mellitus bei Knockout-Tieren spricht auch, dass deren Stamm phänotypisch einen erhöhten Blutzucker- und Insulinspiegel sowie ein erhöhtes Risiko für das Entstehen einer Insulinresistenz aufweist [45, 46]. Gleichzeitig kommt es bei Knockout-Tieren auch zu einem veränderten Lebermetabolismus, der sich ebenfalls auf den Verlauf des Diabetes mellitus auswirken kann [45, 21, 43, 44].

Eine andere Erklärung für die stärkere Akkumulation von Glykogen innerhalb der Niere beim Knockout-Stamm könnte sein, dass ein ChREBP-Knockout zum Wegfall oder Funktionsverlust wichtiger Enzyme des tubulären Glukosemetabolismus führt. Eine wichtige Rolle dabei könnte insbesondere die Glukose-6-Phosphatase (G6-Pase) spielen. Dabei handelt es sich um ein essentielles Enzym im Rahmen der Glukoneogenese, das ermöglicht, die gebildete Glukose durch Dephosphorylierung von Glukose-6-Phosphat (G6P) aus der Zelle zu befördern und so dem Organismus zur Verfügung stellen zu können [107, 32, 97]. Ein Defekt dieses Enzyms führt unter anderem zur Entstehung der Glykogenose Typ 1 (Gierke), bei der Glukose nicht mehr ins Blut abgegeben werden kann und in Form von G6P intra-

zellulär akkumuliert, aus dem dann massiv Glykogen gebildet wird [90]. Zumindest in der Leber wird die G6Pase durch ChREBP induziert und über den Abbau von G6P selbst im Sinne eines negativen Feedbacks reguliert. Anhand von ChREBP-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass damit eine verminderte Expression der G6-Pase und folglich eine vermehrte Glykogeneinlagerung mit Hepatomegalie einhergeht [43, 44, 3]. Darüber hinaus konnte in unserer Arbeitsgruppe demonstriert werden, dass die G6-Pase bei Knockout-Tieren innerhalb von hepatischen Klarzellherden vermindert exprimiert wird, einhergehend mit einer erhöhten Glykogenspeicherung [91, 94, 92]. Innerhalb der Nieren als einem zentralen Ort der Glukoneogenese (siehe 3.1) könnte ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der G6-Pase und dem Auftreten der AEL und GSK bestehen. Tatsächlich kommt es auch in der Niere im Rahmen der Glykogenose Typ 1 (Gierke) zu einer Akkumulation von Glykogen und tubulären Dysfunktion bishin zum Nierenversagen [54, 6]. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein isoliertes Ausschalten der G6-Pase in der Niere von Mäusen (K-G6pc<sup>-/-</sup>) zu einer massiven Glykogeneinlagerung innerhalb der Tubuli führt [13].

Weiterhin ist auffällig, dass die Lokalisation der Glykogeneinlagerungen unterschiedlich ist. Während die GSK ausschließlich im distalen Tubulusepithel vorkommen, so lassen sich die AEL im Zytoplasma von distalen und proximalen Tubuli nachweisen. In Bezug auf letztere ist zudem bemerkenswert, dass sich das Ausschalten von ChREBP stark auf die proximale AEL-Bildung auszuwirken scheint, da bei diesen Tieren die AEL deutlich vermehrt im proximalen Tubulusepithel auftreten. Wichtig hierbei ist es zu betonen, dass bisher glykogenotische Veränderungen im Sinne von AEL beim Menschen oder Ratten vor allem in den distalen Tubuli beobachtet werden konnten [82, 4, 112, 23, 93]. Zudem ist der Einfluss von ChREBP auf die Niere und dessen Beteiligung an der Entstehung einer diabetischen Nephropathie bzw. renalen Glykogenose kaum untersucht [84, 49, 1, 43]. Ein Grund für die hier beobachtete Glykogenakkumulation könnte ebenfalls eine gestörte Funktion der G6-Pase sein. Tatsächlich stellen die proximalen Tubuli den Hauptort der renalen Glukogenese dar und zeigen eine hohe Expression der daran beteiligten Enzyme wie der G6-Pase und PEPCK [107, 97]. Durch einen Knockout-bedingten Ausfall der G6-Pase würden dadurch vor allem die proximalen Tubuli von der gestörten Glukoseabgabe betroffen sein und das akkumulierende G6P in Form der AEL verstärkt einlagern. Allerdings ist noch nicht bekannt, ob die G6-Pase auch in der Niere durch ChREBP exprimiert und reguliert wird [49, 1, 43].

Eine weitere Ursache für die verstärkte Glykogeneinlagerung beim Knockout-Stamm könnte eine gestörte Glukoseaufnahme und -abgabe seitens des renalen Tubulusepithels sein. Der zelluläre Glukose-Ausstrom erfolgt über basolaterale GLUT-2 [32, 70, 97]. Sowohl in der Leber als auch im Pankreas führt ChREBP zu einer erhöhten Expression von GLUT-2 und so zu einem vermehrten zellulären Einstrom in diesen Geweben [44]. In der Niere könnte ChREBP die Expression vom GLUT-2 ebenfalls regulieren. Ein ChREBP-Knockout könnte zu einer verminderten Expression von GLUT-2 führen, dadurch der tubuläre Glukose-Ausstrom, ins-



besondere im proximalen Tubulusepithel, gehemmt werden und in einer Akkumulation von Glukose bzw. Glykogen resultieren. Tatsächlich gibt es Glykogenspeicherkrankheiten wie das Fanconi-Bickel-Syndrom (Glykogenose Typ 11), bei der es durch eine Mutation des GLUT-2 zu einer Akkumulation von Glykogen in Leber und Niere kommt, bedingt durch die Unfähigkeit der Zellen Glukose ans Blut abzugeben. Als Folge kommt es zur Dilatation und Dysfunktion der betroffenen Tubuli [10, 110, 99]. Gegen eine isolierte GLUT-2-Funktionsstörung als Hauptursache für die hier beobachtete Akkumulation von Glykogen in den renalen Tubuluszellen spricht jedoch, dass auch nicht diabetische Tiere Glykogeneinlagerungen zeigen müssten, da auch deren Tubuli bei einem Ausfall von GLUT-2 die Glukose nicht mehr abgeben könnten.

Eine ergänzende Rolle könnten die SGLT-1 und -2 einnehmen. Diese werden vor allem im proximalen Tubulusepithel exprimiert und resorbieren einen Großteil der glomerulär filtrierten Glukose aus dem Primärharn zurück [101, 97]. Je mehr Glukose- bis zu einem Erreichen einer max. Transportkapazität (circa  $10 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$  Glukose)- dabei zur Verfügung steht, desto mehr Glukose wird in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen [97]. Besteht wie im Rahmen eines manifesten Diabetes eine ausgeprägte Hyperglykämie, so kommt es zu einer Hochregulation der SGLT und damit zu einem massiven Anstieg der Glukoseresorption [20, 73]. Dadurch könnte es zu einer Art „Überschwemmung“ der Tubulusepithelien mit Glukose kommen, indem die SGLT massiv Glukose in die Zellen befördern, wodurch wiederum die Entstehung der Glykogenosen begünstigt werden könnte. Dafür spräche unter anderem, dass die glykogenotischen Veränderungen nur bei Tieren mit Diabetes auftreten und vor allem in den proximalen Tubuli lokalisiert sind, die wiederum Hauptlokalisationsort der SGLT sind [97, 73]. Ob oder Inwieweit sich der Knockout von ChREBP auf die SGLT auswirkt ist bislang nicht bekannt. Vorliegend müsste für eine Beteiligung der SGLT am Auftreten der AEL angenommen werden, dass ChREBP entweder keinen oder zumindest einen hemmenden Einfluss auf die Expression der SGLT hat. Würden bei einem Fehlen von ChREBP die SGLT ebenfalls vermindert exprimiert werden, so würde dies im Hinblick auf die zu beobachtende deutlich verstärkte Glykogenakkumulation beim Knockout-Stamm gegen eine SGLT-assoziierte Hauptursache für die Glykogenbildung sprechen.

Ein anderer Grund für die unterschiedliche Lokalisation der AEL innerhalb des renalen Tubulusepithels bei diabetischen WT- und Knockout-Tieren könnte sein, dass distale und proximale Tubuli eine andere Expression von ChREBP aufweisen. In diesem Sinne könnte das proximale TE eine höhere Aktivität von ChREBP aufweisen als die Zellen der distalen Tubuli. Folglich würde sich ein Knockout stärker auf die proximalen Tubuli auswirken, u. a. über die bereits diskutierten Mechanismen. ChREBP wird in den Organsystemen des Körpers unterschiedlich stark exprimiert. Dabei zeigen vor allem Gewebe, die eine wichtige Funktion im Fett- und Glukosestoffwechsel wie die Leber, das Fettgewebe und Pankreas eine erhöhte ChREBP-Expression [45, 43, 44, 1]. Zwar zeigen die Nieren insgesamt ein wohl reduziertes Vorkommen von ChREBP [1, 45]. Allerdings besteht das Nierenparenchym aus einer Reihe

unterschiedlicher Zellen und Strukturen mit jeweils anderen Aufgaben, sodass sich durchaus im Einzelnen höhere Expressionslevel ergeben können. Demnach könnten auch die Zellen des proximalen Tubulusepithels aufgrund ihrer wichtigen Funktionen für die systemische Glukose-Homöostase (Glukoneogenese, SGLT-1/-2-abhängige Glukoseresorption) und folglich ihrer Einflussnahme auf den Glukosestoffwechsel ([107, 32, 97, 109]) vermehrt ChREBP exprimieren.

Zur Diskussion steht weiterhin, ob und inwieweit sich die durchgeführte portale Pankreasinseltransplantation auf die Glykogenspeicherung des renalen Tubulusepithels auswirkt. Beim Wildtyp lässt sich beobachten, dass die diabetischen Tiere ohne Transplantation sowohl nach drei als auch nach sechs Monaten mehr GSK aufweisen als die diabetischen Tiere mit erhaltener Transplantation. Auch die AEL treten nach drei Monaten verstärkt bei den diabetischen, nicht transplantierten Mäusen auf, wobei sich nach sechs Monaten kein Unterschied feststellen lässt. Letzteres könnte jedoch daran liegen, dass die diabetische Wildtyp-Gruppe nach sechs Monaten eine kleinere Tierzahl (n=6) umfasste und ein möglicher Unterschied nicht zum Tragen gekommen ist. Daher ist ein Einfluss auf die Glykogenspeicherung des renalen Tubulusepithels durch die Pankreasinseltransplantation beim Wildtyp anzunehmen. Beim Knockout-Stamm lässt sich hinsichtlich des Auftretens von AEL oder GSK hingegen kein Unterschied zwischen den diabetischen Tieren ohne und mit erhaltener Transplantation nachweisen. Daher ist anzunehmen, dass die Pankreasinseltransplantation beim Knockout-Stamm keinen bzw. kaum Einfluss auf die Bildung glykogenotischer Veränderungen hat.

Eine Ursache dafür könnte sein, dass Wildtyp- und Knockout-Mäuse eine unterschiedliche Insulinempfindlichkeit besitzen. Der Knockout-Stamm gilt wie bereits dargestellt phänotypisch als anfälliger für die Entwicklung einer verminderten Insulinempfindlichkeit [45, 46, 1]. Zudem zeigt das Fettgewebe von ChREBP-Knockout-Tieren eine verminderte Expression von GLUT-4, einer zentralen Struktur bei der Insulin-induzierten zellulären Glukoseaufnahme, sodass als Folge ebenfalls eine Insulinresistenz entsteht [35, 43, 83]. Gleichzeitig wird die Insulinwirkung auf Fettgewebe und Leber teilweise durch CHREBP vermittelt, sodass bei einem Fehlen von letzteren die Insulin- bzw. Glukose-abhängige Induktion von Enzymen der Glykolyse und Lipogenese gehemmt wird [45, 21, 43, 44, 1]. Tatsächlich führte ein isolierter ChREBP-Knockout im Fettgewebe von Mäusen zu einer veränderten Signaltransduktion, einem verminderten Glukosetransport über GLUT-4 sowie zu einer Abnahme der de-novo-Lipogenese in den Adipozyten, begleitet durch eine verstärkte Inflammation. Daraus resultierte schließlich eine Insulinresistenz des Fettgewebes, die sich auch auf die Leber und das Muskelgewebe auswirkte [116]. Ergänzend dazu konnte anhand von Mäusen demonstriert werden, dass ein Ausschalten von CHREBP in der Leber ebenfalls zu einer Insulinresistenz führt, u.a. durch eine daraus resultierende veränderte Enzymexpression und sich daraus entwickelnde Glukosetoleranzstörung [50]. Demnach scheint der Knockout-Stamm durchaus eine herabgesetzte Insulinsensitivität zu besitzen, sodass die glykogenotischen Veränderun-

gen innerhalb der Niere beim Wildtyp durch die Pankreasinseltransplantation und damit verbundener Insulinsekretion beeinflusst werden, während der Knockout-Stamm davon weitgehend unbeeinflusst bleibt.

Über welche Mechanismen sich die Pankreasinseltransplantation in diesem Zusammenhang die portale Pankreasinseltransplantation auf die Nieren und den dort beobachteten Glykogenosen auswirkt ist fraglich. Zum einen müsste dafür die Insulinproduktion der im Pfortaderstromgebiet anwachsenden Inseln so stark sein, dass neben der lokalen Hyperinsulinämie auch eine systemische Wirkung auftritt. Zwar wurde vor dem Versuch getestet und nachgewiesen, dass die pankreatischen Inseln nach der Isolation und weiteren Transplantationsvorbereitung noch vital sind und somit Insulin bilden können. Allerdings wurde nicht direkt evaluiert, wie stark die Insulinproduktion nach dem Anwachsen innerhalb der Leber ist. Aufgrund der hepatischen Veränderungen, die im Rahmen der Kurzzeitexperimente aufgetreten sind [24, 12, 91, 94], ist davon auszugehen, dass ein Großteil der Inseln angewachsen ist und (zumindest) eine lokale Hyperinsulinämie innerhalb der Leber erzielt wird. Betrachtet man den Blutzucker-Verlauf als Parameter einer systemischen Insulinwirkung, so ergeben sich keine hinreichenden Hinweise darauf, dass der Blutzucker durch eine transplantationsassoziierte Insulinproduktion beeinflusst wird. Da der systemische Blutzucker mitunter starken Schwankungen unterliegt, wäre für eine gute Evaluation der Blutzucker-Verläufe und deren Beeinflussung durch die Transplantation eine engmaschigere Kontrolle, bspw. mittels enger gewählter Messintervalle oder einer anderen Messmethodik (z.B. kontinuierliche Sensormessung) mitunter aussagekräftiger.

Unter der Annahme, dass die angewachsenen Inseln über die gesamte Versuchsdauer eine suffiziente Insulinproduktion zeigen, die auch systemisch eine Wirkung entfaltet, stellt sich die Frage, wie genau das Insulin auf das renale Tubulusepithel und die dort beobachteten glykogenotischen Veränderungen auswirken kann. Es konnte anhand von Mäusen (C57BL/6J) gezeigt werden, dass innerhalb der Niere ähnliche Vorkommen des Insulinrezeptors sowie den damit assoziierten IRS-1 und -2 nachzuweisen sind wie in der Leber. Insulin führt dabei über eine IR-vermittelte Signaltransduktion zu einer erhöhten Aktivität von IRS-1 und -2, die durch eine Phosphorylierung ihre Zielstrukturen, insbesondere AKT und FOXO1, aktivieren und die Enzymexpression der Glukoneogenese vermindern [97]. Damit scheint Insulin auch auf das Nierengewebe zur Regulation des systemischen Glukosestoffwechsels und der Glukose-Homöostase verstärkt einzuwirken. Fehlt allerdings Insulin wie im Rahmen eines Diabetes mellitus, so kommt es zu einem Wegfall dieser Insulin-vermittelten Hemmung der Glukoneogenese mit entsprechender Steigerung der Enzymexpression [31, 97]. Daraus ergibt sich ein weiterer Hinweis darauf, dass im Rahmen eines Diabetes das Tubulusepithel infolge des Insulinmangels eine gesteigerte Glukoneogenese betreibt, die potentiell zur Bildung von Glykogenosen, vor allem in Form der AEL, beitragen könnte. Zudem könnte daraus auch die beobachtete Zunahme der Glykogenspeicherung, insbesondere im proximalen Tubulus, durch den Knockout von ChREBP resultieren.

Schließlich fällt auf, dass sich sowohl nach drei als auch nach sechs Monaten kein signifikanter Unterschied beim Auftreten von AEL feststellen lässt, unabhängig davon, ob die diabetischen Tiere eine zusätzliche Transplantation erhalten haben oder nicht. Mithin scheint die Versuchsdauer im Hinblick auf das Auftreten von AEL eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Widerspruch dazu liegen Ergebnisse anderer Forschungsgruppen vor, dass neben der Schwere des Diabetes (gemessen am Ausmaß der Hyperglykämie), auch die zeitliche Dauer eine große Rolle bei der Bildung von AEL zu spielen scheint [37, 51, 113, 95, 109]. Für eine abschließende Klärung, ob die Dauer eines Diabetes zu einer verstärkten AEL-Bildung führt oder nicht, könnte es sinnvoll sein, eine größere zeitliche Spanne zu wählen, da mitunter der zeitliche Abstand zwischen drei und sechs Monaten nicht groß genug sein könnte.

**Tubuläre Proliferationsaktivität** Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuchsgruppen eingesetzt, die sich hinsichtlich einer Reihe von Parametern, die alle eine Auswirkung auf die Proliferationsaktivität des Tubulusepithels haben können, unterscheiden. Dazu zählt zum Einen das Ausschalten des Transkriptionsfaktors ChREBP. Anhand der vorliegenden Ergebnisse scheint ein Knockout von ChREBP bei nicht diabetischen Tieren einen verstärkenden Einfluss auf die Proliferationsaktivität des renalen Tubulusepithels zu haben. Zumindest nach 3M-Versuchsdauer weisen die nicht diabetischen, nicht transplantierten Tiere des Knockout-Stammes eine wesentlich höhere Proliferationsaktivität auf als der Wildtyp. Nach 6M-Versuchsdauer weisen beide Stämme ähnliche Proliferationsaktivitäten auf. Liegt bei den Tieren ein Diabetes vor, so ist zeigt sich eine nur geringfügig veränderte Proliferationsaktivität bei beiden Stämmen. Nach drei Monaten weisen nur die diabetischen Wildtyp-Tiere eine erhöhte Proliferationsaktivität im Vergleich zu der nicht diabetischen, nicht transplantierten Gruppe auf. Nach 6M-Versuchsdauer zeigen die diabetischen Tiere beider Stämme keine Unterschiede in ihrer Proliferationsaktivität im Vergleich zu den nicht diabetischen, nicht transplantierten Tieren. Da das renale Tubulusepithel beider Stämme nach drei und sechs Monaten eine ähnliche Proliferationsaktivität aufweist, scheint auch die Dauer eines Diabetes keinen Einfluss auf die Proliferationsaktivität des renalen Tubulusepithels zu haben. Auch das gleichzeitige Ausschalten von ChREBP führt nicht zu einer veränderten Proliferationsaktivität. Dies erscheint insofern überraschend, da ChREBP in unterschiedlichen Geweben Einfluss auf dessen Differenzierung und Wachstum zeigt. Unter anderem ist ChREBP im Pankreas an der Glukose-induzierten  $\beta$ -Zellproliferation beteiligt, wobei ein Knockout von CHREBP zu einer reduzierten Proliferationsaktivität der  $\beta$ -Zellen führt [74, 126]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Unterdrückung von ChREBP in kolorektalen Tumorzellen (HCT116) und in hepatozellulären Tumorzellen (HepG2) zu einer Abnahme der Proliferationsaktivität und des Tumorwachstums- unter anderem durch Induktion des Tumorsuppressors p53 und dessen Zielgenen- führt [111]. In humanen, Androgen-resistenten Prostata-Carzinomen scheint ChREBP zu einer Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs zu führen und somit die Proliferation der Tumorzellen zu steigern [52]. Schließlich scheint ChREBP auch eine wichtige Rolle bei der AKT/mTOR-vermittelten Zellproliferation und Entwicklung ei-

nes Hepatozellulären Karzinoms zu spielen [91, 94]. Ein weiterer Mechanismus, über den CHREBP Einfluss auf die Proliferationsaktivität nehmen kann, scheint dessen aktivierende Wirkung auf die G6P-Dehydrogenase- einem zentralen Enzym des Pentose-Phosphat-Wegs- zu sein. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass ein ChREBP-Knockout in Mäusen zu einer reduzierten Aktivität der G6P-Dehydrogenase und somit zu einer reduzierten Proliferationsaktivität von Hepatozyten führt [45, 44, 94].

Auch das der bestehende Diabetes mellitus anhand der vorliegenden Ergebnisse keinen relevanten Einfluss auf die Proliferationsaktivität des renalen Tubulusepithels zu haben scheint, widerspricht der Erwartung, dass der Diabetes über chronische Entzündungsprozesse zu einer veränderten Zellproliferation führen kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass es durch die Hyperglykämie und Advanced Glycation Endproducts zu einer Interleukin-6- und Zytokin-vermittelten Aktivierung des NfκB-Signalswegs und damit zu einer chronischen Entzündung innerhalb des Nierenparenchyms kommt [63, 123, 67]. Es konnte mehrfach demonstriert werden, dass eine solche chronische Inflammation zu einer veränderten Proliferationsaktivität bzw. malignen Entartung von verschiedenen Geweben führen kann [69, 72, 15, 62, 58]. Eine wichtige Rolle dabei scheint wiederum der NfκB-Weg zu spielen, der eine zentrale Rolle bei der Regulation von Apoptose, Zellproliferation, Immunantwort sowie Angiogenese inne hat und in vielen Tumorgeweben konstitutiv aktiv ist und so deren Wachstumsverhalten maßgeblich beeinflusst [85, 114, 2, 77]. Demnach wäre auch in der Niere über die chronische Entzündungsreaktion und Hochregulation des NfκB-Signalswegs eine Beeinflussung des Zellwachstums des renalen Tubulusepithels im Rahmen des Diabetes gut vorstellbar, sodass die genauen Mechanismen und Auswirkungen eines Diabetes auf die Proliferationsaktivität des Tubulusepithels weiter untersucht werden sollten.

Haben die Tiere im Rahmen des Versuchs eine Pankreasinseltransplantation erhalten, so wirkt sich dies teilweise stark auf die Proliferationsaktivität aus. So weisen die nicht diabetischen, transplantierten Tiere beider Tierstämme nach drei Monaten im Vergleich zu den nicht diabetischen, nicht transplantierten Tieren eine höhere Proliferationsaktivität auf. Weiterhin fällt auf, dass die Tubuli der transplantierten Knockout-Tiere nach drei Monaten stärker proliferieren als die des Wildtyp-Stammes. Demnach scheint das Insulin besonders auf das tubuläre Wachstum des Knockout-Stammes Einfluss zu haben, obwohl die bereits angeführte Insulinresistenz ([45, 46, 1]) des Knockout-Stammes dem zunächst entgegensteht. Allerdings ist dabei zu unterscheiden, inwiefern sich der Wirkverlust des Insulins manifestiert. Im Wesentlichen existieren bei der Signaltransduktion des Insulins zwei Wege, die es auch hier gilt, zu unterscheiden. Eine Möglichkeit stellt die IR- und IRS-1/-2- vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B bzw. von AKT dar, wodurch vor allem die metabolischen Insulineffekte wie gesteigerte Fettsäure-Synthese, Lipogenese sowie Glykogensynthese induziert werden. Die zweite Möglichkeit bildet der Ras/Raf/MAPK-Weg, über die es -ergänzt durch den AKT/mTOR-Signalsweg- zu einer Förderung des Zellwachstums und der -differenzierung

kommt [60, 8, 38]. Eine Insulinresistenz, wie sie durch das Ausschalten von ChREBP entsteht, manifestiert sich primär durch einen sich metabolisch manifestierenden Wirkverlust von Insulin, der mit einem gestörten Glukose- und Fettstoffwechsel einhergeht [39, 45, 46, 1, 116, 50]. Dagegen bleibt der zweite, mitogene Arm der insulinären Signaltransduktion zunächst unbetroffen und wird suffizient stimuliert, wodurch sich eine erhöhte Wachstumstendenz mit gesteigerter Proliferationsaktivität und Inflammation entwickelt [115, 26]. Somit führt ein Knockout von ChREBP zwar zu einer metabolischen Insulinresistenz, jedoch bleiben davon die mitogenen Wirkungen weitestgehend unberührt oder werden verstärkt, sodass sich dadurch die erhöhte Proliferationsaktivität der nicht diabetischen Knockout-Mäuse nach drei Monaten erklären ließe. Es ist jedoch zu erwähnen, dass bislang nicht abschließend geklärt ist, ob und inwieweit die jeweiligen Zelltypen der Niere (Podozyten, Mesangiumzellen, Tubuluszellen) von einer Insulinresistenz betroffen sind und welche Konsequenzen sich daraus für deren Funktion und Wachstum ergeben [33, 38, 8, 102].

**Entstehung von Tumoren** Das Vorliegen eines Diabetes mellitus scheint zumindest nach 3- und 6-monatiger Versuchsdauer nicht in eine signifikant gesteigerte Tumorbildung zu münden. Dennoch treten beim Wiltyp nur bei diabetischen Tieren (nach 6 Monaten) Tumoren auf. Auch beim Knockout-Stamm entstehen rund 40% der Nierentumoren bei diabetischen Tieren. Diese Beobachtungen können durchaus wie erwartet als Hinweis für einen fördernden Einfluss eines Diabetes bzw. der damit assoziierten glykogenotischen Veränderungen auf die Entstehung von renalen Tumoren gewertet werden. Tatsächlich scheint das Vorliegen eines Diabetes mellitus mit dem Entstehen einer Vielzahl von Tumorerkrankungen assoziiert zu sein. In diesem Sinne konnte bei Patienten mit einem Diabetes ein erhöhtes Risiko sowie eine gesteigerte Mortalität für Karzinome des Pankreas, der Leber, des Gastrointestinaltraktes, der Harnblase und der Niere beobachtet werden [14, 117, 115]. Bei Frauen mit einem Diabetes konnte zudem ein erhöhtes Auftreten von Mamma- und Endometriumskarzinomen beobachtet werden [100]. Die genauen Mechanismen oder Zusammenhänge sind dabei allerdings noch unklar. Vermutlich spielt das Bestehen einer Hyperinsulinämie und die damit verbundenen mitogenen Effekte eine wichtige Rolle ([60, 8, 38]), aber auch Adipositas, der erhöhte oxidative Stress sowie chronische Entzündungsprozesse sind potentielle Faktoren [115]. Darüber hinaus hat auch die Hyperglykämie Einfluss auf die Tumorentwicklung, u.a. über die Beeinflussung der Tumorpherese und Apoptose sowie den invasiven Wachstumseigenschaften und damit der Ausbreitung von Tumoren. Insbesondere der Diabetes mellitus Typ II scheint demnach mit einem erhöhten Malignomrisiko einherzugehen [96]. Ergänzend dazu konnte anhand von diabetischen Ratten gezeigt werden, dass ein Diabetes mellitus das Risiko für das Entstehen von Nierenzellkarzinome erhöht. Dabei scheint unter anderem die tubuläre Einlagerung von AEL und die Ausbildung von präneoplastischen Läsionen in Form von glykogenotisch veränderten, klarzelligeren Tubuli beteiligt zu sein [23]. Ergänzend dazu zeigen weitere, unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass sowohl nach 12- (33% der Tiere) als auch nach 18-monatiger (44% der Tiere) Versuchsdauer Nierentumo-

ren beim Wildtyp nur bei diabetischen Tieren auftreten, wodurch sich die Tumor fördernde Rolle eines Diabetes mellitus weiter untermauern lässt.

Zum anderen scheint auch die Transplantation und die damit einhergehende Insulinproduktion zu keinem offensichtlichen Anstieg der Tumorentstehung zu führen. Zwar scheint das Mehrangebot an Insulin durch die Transplantation die Proliferationsaktivität des renalen Tubulusepithels tlw. zu beeinflussen (s.o), jedoch führt dies nicht direkt zu einer verstärkten Entartung der betroffenen Zellen. Dementsprechend treten bei den Tieren mit erhaltener Transplantation nur sporadisch (Knockout) bis gar keine (Wildtyp) renale Tumoren auf. Im Hinblick auf die Tumorentstehung lässt sich kein potenzierender Einfluss durch eine etwaige, sich systemisch manifestierende Hyperinsulinämie erkennen. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass eine systemische Hyperinsulinämie wie im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ 2 sich verstärkend auf die Tumorgenese auswirkt [14, 117, 115]. Letzlich lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchszeiträumen, geltend für beide Tierstämme, nachweisen. Somit gibt es zumindest nach 3- und 6-monatiger Versuchsdauer keine Hinweise darauf, dass ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Versuchsdauer und der Tumorentstehung vorliegt.

Insgesamt ist festzuhalten, dass vor allem das Ausschalten des Transkriptionsfaktors ChREBP zu einem signifikanten Anstieg der Tumorfrequenz führt, während die anderen Parameter (Diabetes, Inseltransplantation) im Rahmen der hier durchgeführten Versuche zu keinem wesentlichen Anstieg der renalen Tumorbildung geführt haben, unabhängig des jeweiligen Tierstammes und der Versuchszeit. In diesem Sinne könnte ChREBP innerhalb der Niere tumorsuppressive Eigenschaften haben. Auch in anderen Geweben und Zellen scheint ChREBP an der Tumorgenese beteiligt zu sein. Unter anderem ist er vermutlich an der Entstehung vom Prostatakarzinom ([52]), Mammakarzinom ([5]), Kolorektalem Karzinom ([111, 27, 61]) sowie dem Hepatozellulären Karzinom ([91, 94, 92]) beteiligt, die mit einer erhöhten Aktivität von ChREBP assoziiert sind. Zudem sind bereits nach drei und sechs Monaten bei nicht diabetischen ChREBP-Knockout-Tieren vereinzelt klarzellige Tubuli aufgetreten. Dabei handelt es sich um glykogenotisch veränderte Tubuli, die als präneoplastische Läsionen für renale Tumoren gelten [9, 112, 23, 93, 4]. In Ergänzung dazu zeigen weitere, nicht veröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass nach 12-monatiger Versuchsdauer diese klarzelligen Tubuli bei ChREBP-Knockout-Tieren deutlich vermehrt zu finden sind. Durch das Vorkommen dieser Vorläufer-Läsionen beim ChREBP-Knockout-Stamm lässt sich der Einfluss von ChREBP auf die renale Tumorgenese zusätzlich untermauern.

## 7 Fazit und Ausblick

Die wesentliche Fragestellung dieser Arbeit war, anhand von Wildtyp- und Knockout-Mäusen nach drei bzw. sechs Monaten Versuchsdauer die Auswirkungen eines Streptocotozin-induzierten Diabetes und eines Ausschaltens des Transkriptionsfaktors ChREBP, einem zentralen Regulator des Fett- und Glukosestoffwechsels, auf das renale Tubulusepithel zu erforschen. Dabei wurden zum Einen glykogenotische Veränderungen in Form von Armanni-Ebstein-Läsionen (AEL) und Glykogenspeicherkernen (GSK) und zum anderen das Wachstumsverhalten anhand der Proliferationsaktivität sowie der Entstehung von renalen Tumoren untersucht. Ergänzend wurde bei einem Teil der Tiere eine pankreatische Inseltransplantation in das Pfortaderstromgebiet durchgeführt und deren Einfluss auf das renale Tubulusepithels evaluiert.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von ChREBP einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung von glykogenotischen Veränderungen innerhalb der Nierentubuli im Rahmen eines Diabetes mellitus hat. Dabei treten die AEL überwiegend im proximalen, aber auch im distalen Tubulusepithel auf, während die GSK ausschließlich distal vorkommen. Zwischen den Versuchszeiträumen lassen sich keine größeren Unterschiede feststellen, sodass die Dauer eines bestehenden Diabetes keine große Rolle zu spielen scheint. Die genauen, daran beteiligten Mechanismen sind allerdings unklar und bedürfen einer weiterführenden Überprüfung. Schließlich wirkt sich auch die Inseltransplantation auf das Auftreten der glykogenotischen Veränderungen aus. Dabei zeigen vor allem die Wildtyp-Tiere ein reduziertes Vorkommen von GSK und AEL, während der Einfluss beim Knockout-Stamm nicht so stark ausfällt. Eine mögliche Ursache dafür könnte das Vorliegen einer Insulinresistenz beim Knockout-Stamm sein, die sich vor allem durch einen Wirkverlust der metabolischen Effekte des Insulins niederschlägt.

Zusätzlich scheint auch der Knockout von ChREBP in einem veränderten Wachstum des Tubulusepithels zu münden. So zeigen die Knockout-Tiere nach drei Monaten eine erhöhte Proliferationsaktivität. Dabei scheint das zusätzliche Vorliegen des Diabetes keinen wesentlichen Einfluss zu haben. Allerdings lassen sich nach sechs Monaten Versuchsdauer keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Knockout- und Wildtyp-Tieren feststellen.

Außerdem treten beim Knockout-Stamm- vor allem bei den nicht diabetischen Tieren- wesentlich mehr renale Tumoren als beim Wildtyp auf, sodass hier ChREBP scheinbar eine tumorsuppressive Wirkung innerhalb der Niere zukommt. Anhand welcher Mechanismen der Knockout zur vermehrten Entstehung von Tumoren führt, ist unklar und bedarf weiteren Untersuchungen. Dabei könnten der Ras/Raf/MAPK- und/oder der AKT/mTOR-Signalweg beteiligt sein. Ein Zusammenhang zwischen einem Diabetes bzw. den dabei auftretenden glykogenotischen Veränderungen und einem erhöhten Malignomrisiko auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden, da beim Wildtyp nur bei diabetischen



Tieren renale Tumoren aufgetreten und auch beim Knockout-Stamm solche vermehrt bei diabetischen Tieren zu finden sind. Ergänzend dazu zeigen weitere, unveröffentlichte Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass sowohl nach 12- als auch nach 18-monatiger Versuchsdauer Nierentumoren beim Wildtyp vermehrt und nur bei diabetischen Tieren auftreten.

Abschließend scheint der Transkriptionsfaktor ChREBP auch in der Niere eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Glukose-Homöostase und -verarbeitung im Rahmen eines Diabetes mellitus zu spielen. Auch scheint er in gewisser Weise die Wirkung des Insulins auf das renale Tubulusepithels zu beeinflussen, vor allem dessen metabolische Effekte. Darüber hinaus scheint sich durch einen Knockout von ChREBP sich auch das Wachstumsverhalten des renalen Tubulusepithels zu verändern und sogar in eine erhöhte Tumorentstehung zu münden. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht und müssen genauer untersucht werden. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der diabetischen Nephropathie und deren Auswirkungen, insbesondere auf das renale Tubulusepithel, beitragen. Weiterhin könnte dies bei der Klärung der Frage helfen, ob und inwieweit den glykogenotischen Veränderungen innerhalb der Tubuli eine eigene schädigende oder prognostische Bedeutung zukommt. Würden die AEL und/oder GSK tatsächlich zu einer Schädigung oder Funktionsverlust des renalen Tubulusepithels und damit zu einer Verschlechterung der diabetischen Nephropathie bzw. der Nierenfunktion führen, so könnte dies auch therapeutisch von Interesse sein, indem der Verlauf einer diabetischen Nephropathie positiv beeinflusst werden könnte. Ebenso könnte die Beteiligung von ChREBP bzw dessen möglicher Verlust bei der renale Tumorgenese zu einem besseren Verständnis und effektiveren Therapie von renalen Malignomen beitragen.

## 8 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor ChREBP ist ein zentraler Regulator des Fett- und Glukosestoffwechsels und wird insbesondere in der Leber intensiv erforscht. Allerdings ist seine Rolle in der Niere, die maßgeblich an der Glukose-Homöostase beteiligt ist und einen wichtigen Ort der Glukoneogenese darstellt, noch weitgehend unerforscht.

Zentrales Ziel dieser Arbeit ist es, im Rahmen des hepatischen Pankreasinseltransplantationsmodells die Auswirkungen eines Diabetes mellitus und eines Fehlens des Transkriptionsfaktors CHREBP auf das renale Tubulusepithel anhand von Wildtyp- und ChREBP-Knockout-Mäusen über einen Versuchszeitraum von drei bzw. sechs Monaten zu evaluieren. Dazu wurden die tubuläre Glykogenspeicherung in Form von Glykogenspeicherkernen und Armanni-Ebstein-Läsionen, die Proliferationsaktivität des renalen Tubulusepithels sowie das Auftreten von renalen Tumoren untersucht.

Das Vorliegen eines Diabetes mellitus führt in der Niere der Wildtyp-Mäuse zu einer tubulären Glykogenakkumulation, die durch einen ChREBP-Knockout deutlich verstärkt wurde. Diese Glykogenspeicherung fehlte bei nicht diabetischen Tieren völlig. Gleichzeitig ließ sich bei diabetischen Wildtyp-Tieren eine zum Teil erhöhte Proliferationsaktivität sowie das Auftreten von Nierentumoren beobachten. Das Ausschalten des Transkriptionsfaktors ChREBP führte nicht nur zu einem vermehrten Auftreten von Glykogenspeicherkernen und Armanni-Ebstein-Läsionen, sondern resultierte auch in einem deutlich gesteigertem Vorkommen von renalen Tumoren. Diese Tumoren traten hier auch ohne das gleichzeitige Vorliegen eines Diabetes mellitus auf. Auch die Proliferationsaktivität der Tubulusepithelien war bei den ChREBP-Knockout-Mäusen gesteigert.

Somit führt ein Diabetes mellitus, insbesondere bei einem gleichzeitigem Knockout von ChREBP, zu einer Akkumulation von Glykogen innerhalb der renalen Tubulusepithelien und fördert die Entstehung von Tumoren in der Niere bei Mäusen. Auch ein Knockout von ChREBP scheint- unabhängig vom Vorliegen eines Diabetes- einen fördernden Einfluss auf die renale Tumorgenese zu haben. Allerdings sind die daran beteiligten Mechanismen noch weitgehend unbekannt. Daher sollte die Rolle von ChREBP und die Bedeutung der diabetisch bedingten tubulären Veränderungen in Form der Glykogenspeicherkerne und Armanni-Ebstein-Läsionen innerhalb der Niere, insbesondere für die Tumorgenese, weiter untersucht werden.

## Literaturverzeichnis

- [1] A. Abdul-Wahed, S. Guilmeau und C. Postic. “Sweet Sixteenth for ChREBP: Established Roles and Future Goals”. In: *Cell Metabolism* 26.2 (2017), S. 324–341. URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413117304254>.
- [2] B. B. Aggarwal, S. Shishodia, S. K. Sandur, M. K. Pandey und G. Sethi. “Inflammation and cancer: How hot is the link?” In: *Biochemical Pharmacology* 72.11 (2006), S. 1605–1621.
- [3] L. Agius, S. S. Chachra und B. E. Ford. “The Protective Role of the Carbohydrate Response Element Binding Protein in the Liver: The Metabolite Perspective”. In: *Frontiers in Endocrinology* 11.November (2020), S. 1–10.
- [4] Y. S. Ahn, H. Zerban, R. Grobholz und P. Bannasch. “Sequential changes in glycogen content, expression of glucose transporters and enzymic patterns during development of clear/acidophilic cell tumors in rat kidney”. In: *Carcinogenesis* 13.12 (1992), S. 2329–2334.
- [5] R. E. Airley, P. McHugh, A. R. Evans, B. Harris, L. Winchester, F. M. Buffa, W. Al-Tameemi, R. Leek und A. L. Harris. “Role of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) in generating an aerobic metabolic phenotype and in breast cancer progression (Abstract)”. In: *British Journal of Cancer* 110.3 (2014), S. 715–723.
- [6] B. Aoun, S. Sanjad, J. A. Degheili, A. Barhoumi, A. Bassyouni und P. E. Karam. “Kidney and Metabolic Phenotypes in Glycogen Storage Disease Type-I Patients”. In: *Frontiers in Pediatrics* 8.September (2020), S. 1–7.
- [7] C. Arden, S. J. Tudhope, J. L. Petrie, Z. H. Al-Oanzi, K. S. Cullen, A. J. Lange, H. C. Towle und L. Agius. “Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes”. In: *Biochemical Journal* 443.1 (2012), S. 111–123.
- [8] F. Artunc, E. Schleicher, C. Weigert, A. Fritsche, N. Stefan und H. U. Häring. “The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature”. In: *Nature Reviews Nephrology* 12.12 (2016), S. 721–737.
- [9] P. Bannasch, R. Krech und H. Zerban. “Morphogenesis and micromorphology of epithelial tumors induced in the rat kidney by nitrosomorpholine - II. Tubular glycogenosis and the genesis of clear or acidophilic cell tumors”. In: *Zeitschrift für Krebsforschung und klinische Onkologie. Cancer research and clinical oncology* 92 (1978), S. 63–86.
- [10] G. T. Berry, L. Baker, F. S. Kaplan und C. L. Witzleben. “Diabetes-like renal glomerular disease in Fanconi-Bickel syndrome”. In: *Pediatric Nephrology* 9.3 (1995), S. 287–291.

- [11] I. Besenthal und B. Neumeister. “Glukosestoffwechsel”. In: *Labordiagnostik Klinikleitfaden*. Hrsg. von B. Neumeister und B. O. Böhm. 5. Auflage. München: Elsevier, 2015. Kap. 7, S. 125–144.
- [12] D. F. Calvisi, C. Wang, C. Ho, S. Ladu, S. A. Lee, S. Mattu, G. Destefanis, S. Delogu, A. Zimmermann, J. Ericsson, S. Brozzetti, T. Staniscia, X. Chen, F. Dombrowski und M. Evert. “Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma”. In: *Gastroenterology* 140.3 (2011), 1071–1083.e5.
- [13] J. Clar, B. Gri, J. Calderaro, M. C. Birling, Y. Héroult, G. P. A. Smit, G. Mithieux und F. Rajas. “Targeted deletion of kidney glucose-6 phosphatase leads to nephropathy”. In: *Kidney International* 86.4 (2014), S. 747–756.
- [14] S. S. Coughlin, E. E. Calle, L. R. Teras, J. Petrelli und M. J. Thun. “Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults”. In: *American Journal of Epidemiology* 159.12 (2004), S. 1160–1167.
- [15] S. M. Crusz und F. R. Balkwill. “Inflammation and cancer: Advances and new agents”. In: *Nature Reviews Clinical Oncology* 12.10 (2015), S. 584–596.
- [16] A. Czajka und A. N. Malik. “Hyperglycemia induced damage to mitochondrial respiration in renal mesangial and tubular cells: Implications for diabetic nephropathy”. In: *Redox Biology* 10.9 (2016), S. 100–107.
- [17] A. Czajka und A. N. Malik. “Hyperglycemia induced damage to mitochondrial respiration in renal mesangial and tubular cells: Implications for diabetic nephropathy”. In: *Redox Biology* 10.9 (2016), S. 100–107.
- [18] M. N. Davies, B. L. O’Callaghan und H. C. Towle. “Activation and repression of glucose-stimulated ChREBP requires the concerted action of multiple domains within the MondoA conserved region”. In: *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 299.4 (2010), E665–E674.
- [19] M. N. Davies, B. L. O’Callaghan und H. C. Towle. “Glucose activates ChREBP by increasing its rate of nuclear entry and relieving repression of its transcriptional activity”. In: *Journal of Biological Chemistry* 283.35 (2008), S. 24029–24038.
- [20] C. C. Dekkers, R. T. Gansevoort und H. J. Heerspink. “New Diabetes Therapies and Diabetic Kidney Disease Progression: the Role of SGLT-2 Inhibitors”. In: *Current Diabetes Reports* 18.5 (2018).
- [21] R. Dentin, F. Benhamed, I. Hainault, V. Fauveau, F. Fougère, J. R. Dyck, J. Girard und C. Postic. “Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice”. In: *Diabetes* 55.8 (2006), S. 2159–2170.

- [22] R. Deutzmann. “Hormone”. In: *Biochemie-Duale Reihe*. Hrsg. von J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2012. Kap. 3 (Teil D), S. 557–626.
- [23] F. Dombrowski, L. Klotz, P. Bannasch und M. Evert. “Renal carcinogenesis in models of diabetes in rats - Metabolic changes are closely related to neoplastic development”. In: *Diabetologia* 50.12 (2007), S. 2580–2590.
- [24] F Dombrowski, M Lehringer-Polzin und U Pfeifer. “Hyperproliferative liver acini after intraportal islet transplantation in streptozotocin-induced diabetic rats”. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 71 (1994), S. 688–699.
- [25] F. Dombrowski und U. Pfeifer. “Hyperproliferative State of Liver Acini and Pancreatic Islets after Intraportal Transplantation of a Small Mass of Islets of Langerhans in Streptozotocininduced Diabetic Rats”. In: *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 103 Suppl (1995), S. 112–117.
- [26] R. D’Oria, L. Laviola, F. Giorgino, V. Unfer, S. Bettocchi und M. Scioscia. “PKB/Akt and MAPK/ERK phosphorylation is highly induced by inositols: Novel potential insights in endothelial dysfunction in preeclampsia”. In: *Pregnancy Hypertension* 10.11 (2017), S. 107–112.
- [27] G. Filhoulaud, S. Guilmeau, R. Dentin, J. Girard und C. Postic. “Novel insights into ChREBP regulation and function”. In: *Trends in Endocrinology and Metabolism* 24.5 (2013), S. 257–268.
- [28] N. Flemming, Hons, L. Gallo und J. M. Forbes. “Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Diabetic Kidney Disease: Oxidative Stress and Beyond”. In: *Seminars in Nephrology* 38.2 (2018), S. 101–110.
- [29] M. Fukasawa, Q. Ge, R. M. Wynn, S. Ishii und K. Uyeda. “Coordinate regulation/localization of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP) by two nuclear export signal sites: Discovery of a new leucine-rich nuclear export signal site”. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 391.2 (2010), S. 1166–1169.
- [30] A. Gastaldelli und K. Cusi. “From NASH to diabetes and from diabetes to NASH: Mechanisms and treatment options”. In: *JHEP Reports* 1.4 (2019), S. 312–328.
- [31] R. Gatica, R. Bertinat, P. Silva, D. Carpio, M. J. Ramírez, J. C. Slebe, R. S. Martín, F. Nualart, J. M. Campistol, C. Caelles und A. J. Yáñez. “Altered expression and localization of insulin receptor in proximal tubule cells from human and rat diabetic kidney”. In: *Journal of Cellular Biochemistry* 114.3 (2013), S. 639–649.

- [32] J. E. Gerich. “Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications”. In: *Diabetic Medicine* 27.2 (2010), S. 136–142.
- [33] L. Gnudi, R. J. Coward und D. A. Long. “Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel Molecular Mechanisms”. In: *Trends in Endocrinology and Metabolism* 27.11 (2016), S. 820–830.
- [34] A. M. Hall, R. J. Unwin, N. Parker und M. R. Duchon. “Multiphoton imaging reveals differences in mitochondrial function between nephron segments”. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 20.6 (2009), S. 1293–1302.
- [35] M. A. Herman, O. D. Peroni, J. Villoria, M. R. Schön, N. A. Abumrad, M. Blüher, S. Klein und B. B. Kahn. “A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism”. In: *Nature* 484 (2012), S. 333–338.
- [36] G. et. al Herold. “Endokrinologie”. In: *Innere Medizin*. Hrsg. von G. et. al Herold. Köln: Herold, 2019. Kap. 9, S. 722–805.
- [37] P. Holck und R. Rasch. “Structure and Segmental Localization of Glycogen in the Diabetic Rat Kidney”. In: *Diabetes* 42.6 (1993), S. 891–900.
- [38] S. Horita, M. Nakamura, M. Suzuki, N. Satoh, A. Suzuki und G. Seki. “Selective insulin resistance in the kidney”. In: *BioMed Research International* 2016 (2016).
- [39] F. Horn, I. Moc und S. Berghold. “Energieversorgung”. In: *Biochemie des Menschen*. Hrsg. von F. Horn. 7. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2019. Kap. 21, S. 397–426.
- [40] R. Horton, L. A. Moran, G. K. Scrimgeour, M. D. Perry und D. J. Rawn. “Glucose, Pentosephosphatweg und Glykogenstoffwechsel”. In: *Biochemie*. Hrsg. von R. Horton, L. A. Moran, G. K. Scrimgeour, M. D. Perry und D. J. Rawn. 4. Auflage. München: Pearson Studium, 2008. Kap. 12, S. 479–513.
- [41] C. Hurtado Del Pozo, G. Vesperinas-García, M. Á. Rubio, R. Corripio-Sánchez, A. J. Torres-García, M. J. Obregon und R. M. Calvo. “ChREBP expression in the liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity”. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811.12 (2011), S. 1194–1200.
- [42] Y. Ido-Kitamura, T. Sasaki, M. Kobayashi, H. J. Kim, Y. S. Lee, O. Kikuchi, H. Yokota-Hashimoto, K. Iizuka, D. Accili und T. Kitamura. “Hepatic FoxO1 Integrates Glucose Utilization and Lipid Synthesis through Regulation of ChREBP O-Glycosylation”. In: *PLoS ONE* 7.10 (2012), e47231.
- [43] K. Iizuka. “Recent progress on the role of ChREBP in glucose and lipid metabolism”. In: *Endocrine Journal* 60.5 (2013), S. 543–555.

- [44] K. Iizuka. “The transcription factor carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP): A possible link between metabolic disease and cancer”. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1863.2 (2017), S. 474–485.
- [45] K. Iizuka, R. K. Bruick, G. Liang, J. D. Horton und K. Uyeda. “Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.19 (2004), 7281 LP –7286.
- [46] K. Iizuka, B. Miller und K. Uyeda. “Deficiency of carbohydrate-activated transcription factor ChREBP prevents obesity and improves plasma glucose control in leptin-deficient (ob/ob) mice”. In: *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 291.2 (2006), S. 358–364.
- [47] International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas, 8th edition*. Techn. Ber. Brüssel, Belgien: International Diabetes Federation, 2017.
- [48] T. Isoe, Y. Makino, K. Mizumoto, H. Sakagami, Y. Fujita, J. Honjo, Y. Takiyama, H. Itoh und M. Haneda. “High glucose activates HIF-1-mediated signal transduction in glomerular mesangial cells through a carbohydrate response element binding protein”. In: *Kidney International* 78.1 (2010), S. 48–59.
- [49] T. Jois und M. W. Sleeman. “The regulation and role of carbohydrate response element-binding protein in metabolic homeostasis and disease”. In: *Journal of Neuroendocrinology* 29.10 (2017), e12473.
- [50] T. Jois, W. Chen, V. Howard, R. Harvey, K. Youngs, C. Thalmann, P. Saha, L. Chan, M. A. Cowley und M. W. Sleeman. “Deletion of hepatic carbohydrate response element binding protein (ChREBP) impairs glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice”. In: *Molecular Metabolism* 6.11 (2017), S. 1381–1394.
- [51] J Kang, X.-S. Dai, T.-B. Yu, B Wen und Z.-W. Yang. “Glycogen accumulation in renal tubules, a key morphological change in the diabetic rat kidney”. In: *Acta Diabetologica* 42.2 (2005), S. 110–116.
- [52] A. K. Kaushik, A. Shojaie, K. Panzitt, R. Sonavane, H. Venghatakrishnan, M. Manikkam, A. Zaslavsky, V. Putluri, V. T. Vasu, Y. Zhang, A. S. Khan, S. Lloyd, A. T. Szafran, S. Dasgupta, D. A. Bader, F. Stossi, H. Li, S. Samanta, X. Cao, E. Tsouko, S. Huang, D. E. Frigo, L. Chan, D. P. Edwards, B. A. Kaiparettu, N. Mitsiades, N. L. Weigel, M. Mancini, S. E. McGuire, R. Mehra, M. M. Ittmann, A. M. Chinaiyan, N. Putluri, G. S. Palapattu, G. Michailidis und A. Sreekumar. “Inhibition of the hexosamine biosynthetic pathway promotes castration-resistant prostate cancer (Abstract)”. In: *Nature Communications* 7 (2016), S. 11612.
- [53] J. Kiernan. “Carbohydrate Histochemistry”. In: *Education Guide - Special Stains and H&E*. Hrsg. von J. Kiernan und G. Kumar. 2. Auflage. Carpinteria: DAKO, 2010. Kap. 9, S. 75–92.

- [54] P. S. Kishnani, S. L. Austin, J. E. Abdenur, P. Arn, D. S. Bali, A. Boney, W. K. Chung, A. I. Dagli, D. Dale, D. Koeberl, M. J. Somers, S. Burns Wechsler, D. A. Weinstein, J. I. Wolfsdorf und M. S. Watson. “Diagnosis and management of glyco- gen storage disease type I: A practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics”. In: *Genetics in Medicine* 16.11 (2014), S. 1–29.
- [55] H. Kitsunai, Y. Makino, H. Sakagami, K. Mizumoto, T. Yanagimachi, K. Atagel- diyeva, Y. Takeda, Y. Fujita, A. Abiko, Y. Takiyama und M. Haneda. “High glucose induces platelet-derived growth factor-C via carbohydrate response element-binding protein in glomerular mesangial cells”. In: *Physiological Reports* 4.6 (2016), e12730.
- [56] R. Knuechel-Clarke und K. Lindemann-Docter. “Niere und ableitende Harnwege”. In: *Grundmann- Kurzlehrbuch Pathologie*. Hrsg. von T. Kirchner, H. Mueller-Hermelink und A. Roessner. 12. Auflag. München: Elsevier, 2014. Kap. 12, S. 359–374.
- [57] M. Königshoff und T. Brandenburger. “Lipide”. In: *Kurzlehrbuch Biochemie*. Hrsg. von M. Königshoff und T. Brandenburger. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2018. Kap. 3, S. 55–84.
- [58] A. Korniluk, O. Koper, H. Kemonia und V. Dymicka-Piekarska. “From inflammation to cancer”. In: *Irish Journal of Medical Science* 186.1 (2017), S. 57–62.
- [59] X. Lau, Y. Zhang, D. J. Kelly und D. I. Stapleton. “Attenuation of Armanni-Ebstein lesions in a rat model of diabetes by a new anti-fibrotic, anti-inflammatory agent, FT011”. In: *Diabetologia* 56.3 (2013), S. 675–679.
- [60] H. E. Lebovitz. “Insulin resistance definition and facts”. In: *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 109 (2001), S. 135–148.
- [61] Y. Lei, S. Zhou, Q. Hu, X. Chen und J. Gu. “Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) correlates with colon cancer progression and contributes to cell proliferation”. In: *Scientific Reports* 10.1 (2020), S. 1–10.
- [62] W. Liang und N. Ferrara. “The complex role of Neutrophils in tumor angiogenesis and metastasis”. In: *Cancer Immunology Research* 4.2 (2016), S. 83–91.
- [63] M. Lin, W. H. Yiu, H. J. Wu, L. Y. Chan, J. C. Leung, W. S. Au, K. W. Chan, K. N. Lai und S. C. Tang. “Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy”. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 23.1 (2012), S. 86–102.
- [64] R. Lüllmann-Rauch. “Anhang”. In: *Taschenlehrbuch Histologie*. Hrsg. von R. Lüllmann- Rauch. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2012. Kap. 27, S. 629–680.
- [65] R. Lüllmann-Rauch. “Zellorganellen und Zytosol”. In: *Taschenlehrbuch Histologie*. Hrsg. von R. Lüllmann-Rauch. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2012. Kap. 5, S. 44–72.



- [66] S. Y. Lunt und M. G. Vander Heiden. “Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation”. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27.1 (2011), S. 441–464.
- [67] J. Ma, S. J. Chadban, C. Y. Zhao, X. Chen, T. Kwan, U. Panchapakesan, C. A. Pollock und H. Wu. “TLR4 activation promotes podocyte injury and interstitial fibrosis in diabetic nephropathy”. In: *PLoS ONE* 9.5 (2014).
- [68] L. Ma, L. N. Robinson und H. C. Towle. “ChREBP·Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver”. In: *Journal of Biological Chemistry* 281.39 (2006), S. 28721–28730.
- [69] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica und F. Balkwill. “Cancer-related inflammation”. In: *Nature* 454.7203 (2008), S. 436–444.
- [70] A. Mather und C. Pollock. “Glucose handling by the kidney.” In: *Kidney international. Supplement* 79.120 (2011), S1–S6.
- [71] L. G. McFerrin und W. R. Atchley. “A novel N-terminal domain may dictate the glucose response of mondo proteins”. In: *PLoS ONE* 7.4 (2012), e34803.
- [72] L. B. Meira, J. M. Bugni, S. L. Green, C. W. Lee, B. Pang, D. Borenshtein, B. H. Rickman, A. B. Rogers, C. A. Moroski-Erkul, J. L. McFaline, D. B. Schauer, P. C. Dedon, J. G. Fox und L. D. Samson. “DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice”. In: *Journal of Clinical Investigation* 118.7 (2008), S. 2516–2525.
- [73] C. W. Mende. “Diabetes and kidney disease: the role of sodium–glucose cotransporter-2 (SGLT-2) and SGLT-2 inhibitors in modifying disease outcomes”. In: *Current Medical Research and Opinion* 33.3 (2017), S. 541–551.
- [74] M. R. Metukuri, P. Zhang, M. K. Basantani, C. Chin, R. E. Stamateris, L. C. Alonso, K. K. Takane, R. Gramignoli, S. C. Strom, R. M. O’Doherty, A. F. Stewart, R. C. Vasavada, A. Garcia-Ocaña und D. K. Scott. “ChREBP mediates glucose-stimulated pancreatic  $\beta$ -cell proliferation”. In: *Diabetes* 61.8 (2012), S. 2004–2015.
- [75] C. Meyer, J. M. Dostou, S. L. Welle und J. E. Gerich. “Role of human liver, kidney, and skeletal muscle in postprandial glucose homeostasis”. In: *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 282.2 45-2 (2002), S. 419–427.
- [76] C. Meyer, M. Stumvoll, V. Nadkarni, J. Dostou, A. Mitrakou und J. Gerich. “Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus”. In: *Journal of Clinical Investigation* 102.3 (1998), S. 619–624.
- [77] S. Mitchell, J. Vargas und A. Hoffmann. “Signaling via the NF $\kappa$ B system”. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 8.3 (2016), S. 227–241.

- [78] H. Moch, D. Kerjaschki, R. Kain und K. Amann. "Niere". In: *Pathologie*. Hrsg. von W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz, G. Höfler, H. Kreipe und H. Moch. 5. Auflage. München: Elsevier GmbH, 2012. Kap. 37, S. 693–720.
- [79] D. Mueller-Wieland, H. Renz-Polster und H. J. Frercks. "Stoffwechsel". In: *Basislehrbuch Innere Medizin*. Hrsg. von J. Braun und D. Mueller-Wieland. 6. Auflage. München: Elsevier GmbH, 2018. Kap. 9, S. 733–801.
- [80] A. C. Muntau und A. Lotz-Havla. "Stoffwechselerkrankungen". In: *Kurzlehrbuch Pädiatrie*. Hrsg. von A. C. Muntau. 1. Auflage. München: Elsevier GmbH, 2015. Kap. 6, S. 73–110.
- [81] National Center for Biotechnology Information. *5-Bromo-2'-deoxyuridine*, CID=6035. 2019. URL: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Bromo-2'\\\_}-deoxyuridine](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Bromo-2'\_}-deoxyuridine) (besucht am 26.08.2019).
- [82] E. Nogueira, F. Klimek, E. Weber und P. Bannasch. "Collecting duct origin of rat renal clear cell tumors". In: *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology* 57.1 (1989), S. 275–283.
- [83] A. M. Nuotio-Antar, N. Pongvarin, M. Li, M. Schupp, M. Mohammad, S. Gerard, F. Zou und L. Chan. "FABP4-cre mediated expression of constitutively active ChREBP protects against obesity, fatty liver, and insulin resistance". In: *Endocrinology* 156.11 (2015), S. 4020–4032.
- [84] M.-J. Park, D.-I. Kim, S.-K. Lim, J.-H. Choi, H.-J. Han, K.-C. Yoon und S.-H. Park. "High Glucose-induced O -GlcNAcylated Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP) Mediates Mesangial Cell Lipogenesis and Fibrosis". In: *Journal of Biological Chemistry* 289.19 (2014), S. 13519–13530.
- [85] E. Pikarsky, R. M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Uriell-Shoval, E. Galun und Y. Ben-Neriah. "NF- $\kappa$ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer". In: *Nature* 431.7007 (2004), S. 461–466.
- [86] N. Pongvarin, B. Chang, M. Imamura, J. Chen, K. Moolsuwan, C. Sae-Lee, W. Li und L. Chan. "Genome-Wide Analysis of ChREBP Binding Sites on Male Mouse Liver and White Adipose Chromatin". In: *Endocrinology* 156.6 (2015), S. 1982–1994.
- [87] J. Rassow. "Abbau der Kohlenhydrate zu Pyruvat bzw. Lactat". In: *Biochemie- Duale Reihe*. Hrsg. von J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2012. Kap. Abbau der, S. 70–96.
- [88] J. Rassow. "Biochemie der Leber". In: *Biochemie-Duale Reihe*. Hrsg. von J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann. 3.Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2012. Kap. 2 (Teil F), S. 745–749.
- [89] J. Rassow. "Die Bereitstellung von Fettsäuren, Triacylglycerinen und Ketonkörpern". In: *Biochemie-Duale Reihe*. 2012. Kap. 13 (Teil A, S. 221–251).

- [90] J. Rassow. “Speicherung und Bereitstellung von Kohlenhydraten”. In: *Biochemie-Duale Reihe*. Hrsg. von J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker und R. Deutzmann. 3. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2012. Kap. 12 (Teil A, S. 200–220).
- [91] S. Ribback, D. F. Calvisi, A. Cigliano, V. Sailer, M. Peters, J. Rausch, C.-d. Heidecke, M. Birth und F. Dombrowski. “Molecular and metabolic changes in human liver clear cell foci resemble the alterations occurring in rat hepatocarcinogenesis”. In: *Journal of Hepatology* 58 (2013), S. 1147–1156.
- [92] S. Ribback, L. Che, M. G. Pilo, A. Cigliano, G. Latte, G. M. Pes, A. Porcu, R. M. Pascuale, L. Li, Y. Qiao, F. Dombrowski, X. Chen und D. F. Calvisi. “Oncogene-dependent addiction to carbohydrate-responsive element binding protein in hepatocellular carcinoma”. In: *Cell Cycle* 17.12 (2018), S. 1496–1512.
- [93] S. Ribback, A. Cigliano, N. Kroeger, M. G. Pilo, L. Terracciano, M. Burchardt, P. Bannasch, D. F. Calvisi und F. Dombrowski. “PI3K/AKT/mTOR pathway plays a major pathogenetic role in glycogen accumulation and tumor development in renal distal tubules of rats and men”. In: *Oncotarget* 6.15 (2015), S. 13036–13048.
- [94] S. Ribback, J. Sonke, A. Lohr, J. Frohme, K. Peters, J. Holm, M. Peters, A. Cigliano, D. F. Calvisi und F. Dombrowski. “Hepatocellular glycogenotic foci after combined intraportal pancreatic islet transplantation and knockout of the carbohydrate responsive element binding protein in diabetic mice”. In: *Oncotarget* 8.61 (2017), S. 104315–104329.
- [95] S. Ritchie und D. Waugh. “The pathology of Armanni-Ebstein diabetic nephropathy”. In: *The American journal of pathology* 33.6 (1957), S. 1035–1057.
- [96] T. Y. Ryu, J. Park und P. E. Scherer. “Hyperglycemia as a risk factor for cancer progression”. In: *Diabetes and Metabolism Journal* 38.5 (2014), S. 330–336.
- [97] M. Sasaki, T. Sasako, N. Kubota, Y. Sakurai, I. Takamoto, T. Kubota, R. Inagi, G. Seki, M. Goto, K. Ueki, M. Nangaku, T. Jomori und T. Kadowaki. “Dual regulation of gluconeogenesis by insulin and glucose in the proximal tubules of the kidney”. In: *Diabetes* 66.9 (2017), S. 2339–2350.
- [98] S. Sato, H. Jung, T. Nakagawa, R. Pawlosky, T. Takeshima, W.-R. Lee, H. Sakiyama, S. Laxman, R. M. Wynn, B. P. Tu, J. B. MacMillan, J. K. De Brabander, R. L. Veech und K. Uyeda. “Metabolite Regulation of Nuclear Localization of Carbohydrate-response Element-binding Protein (ChREBP)”. In: *Journal of Biological Chemistry* 291.20 (2016), S. 10515–10527.
- [99] S. Sharari, M. Abou-Alloul, K. Hussain und F. A. Khan. “Fanconi–bickel syndrome: A review of the mechanisms that lead to dysglycaemia”. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21.17 (2020), S. 1–21.

- [100] K. Shikata, T. Ninomiya und Y. Kiyohara. “Diabetes mellitus and cancer risk: Review of the epidemiological evidence”. In: *Cancer Science* 104.1 (2013), S. 9–14.
- [101] S. Silbernagl. “Die Funktion der Nieren”. In: *Physiologie*. Hrsg. von S. Silbernagl, A. Kurtz und H.-C. Pape. 7. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2014. Kap. 10, S. 379–438.
- [102] S. Singh, R. Sharma, M. Kumari und S. Tiwari. “Insulin receptors in the kidneys in health and disease”. In: *World Journal of Nephrology* 8.1 (2019), S. 11–22.
- [103] J. Spranger und A. C. Powers. “Diabetes mellitus: Diagnostik, Klassifikation und Pathophysiologie”. In: *Harrisons Innere Medizin. Band 3*. Hrsg. von N. Suttorp, M. Möckel, B. Siegmund und M. Dietel. 19. Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2016. Kap. 417, S. 2945–2954.
- [104] J. Spranger und A. C. Powers. “Diabetes mellitus: Komplikationen”. In: *Harrisons Innere Medizin. Band 3*. Hrsg. von N. Suttorp, M. Möckel, B. Siegmund und M. Dietel. 19. Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2016. Kap. 419, S. 2974–2982.
- [105] T. Stallmach, G. A. Spinas und C. Röcken. “Stoffwechselerkrankungen”. In: *Pathologie*. Hrsg. von W. Böcker, H. Denk und P. Heitz. 5. Auflage. München: Elsevier GmbH, 2012. Kap. 47, S. 913–932.
- [106] A. K. Stoeckman, L. Ma und H. C. Towle. “Mlx Is the Functional Heteromeric Partner of the Carbohydrate Response Element-binding Protein in Glucose Regulation of Lipogenic Enzyme Genes”. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.15 (2004), S. 15662–15669.
- [107] M. Stumvoll, C. Meyer, A. Mitrakou, V. Nadkarni und J. E. Gerich. “Renal glucose production and utilization: new aspects in humans”. In: *Diabetologia* 40.7 (1997), S. 749–757.
- [108] M. Stumvoll, G. Perriello, C. Meyer und J. Gerich. “Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues”. In: *Kidney International* 55.3 (1999), S. 778–792.
- [109] M. A. Sullivan und J. M. Forbes. “Glucose and glycogen in the diabetic kidney: Heroes or villains?” In: *EBioMedicine* 47 (2019), S. 590–597.
- [110] B. Thorens. “GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis”. In: *Diabetologia* 58.2 (2015), S. 221–232.
- [111] X. Tong, F. Zhao, A. Mancuso, J. J. Gruber und C. B. Thompson. “The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation”. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.51 (2009), S. 21660–21665.

- [112] H. Tsuda, T. Iwase, K. Matsumoto, M. Ito, I. Hirono, Y. Nishida, N. Takasuka, Y. Iwahori, T. Ota, D. J. Kim und B. Kadenbach. "Histogenetic stereological reconstruction of rat basophilic, clear, and oncocytic neoplastic renal cell lesions using carbonic anhydrase type II-PAS double-stained sections". In: *Toxicologic Pathology* 26.6 (1998), S. 769–776.
- [113] V. Vallon und R. Komers. "Pathophysiology of the Diabetic Kidney". In: *Comprehensive Physiology* 1 (2011), S. 1175–1232.
- [114] P. Viatour, M. P. Merville, V. Bours und A. Chariot. "Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: Implications in cancer and inflammation". In: *Trends in Biochemical Sciences* 30.1 (2005), S. 43–52.
- [115] P. Vigneri, F. Frasca, L. Sciacca, G. Pandini und R. Vigneri. "Diabetes and cancer". In: *Endocrine-Related Cancer* 16.4 (2009), S. 1103–1123.
- [116] A. Vijayakumar, P. Aryal, J. Wen, I. Syed, R. P. Vazirani, P. M. Moraes-Vieira, J. P. Camporez, M. R. Gallop, R. J. Perry, O. D. Peroni, G. I. Shulman, A. Saghatelian, T. E. McGraw und B. B. Kahn. "Absence of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Adipocytes Causes Systemic Insulin Resistance and Impairs Glucose Transport". In: *Cell Reports* 21.4 (2017), S. 1021–1035.
- [117] C. Wang, X. Wang, G. Gong, Q. Ben, W. Qiu, Y. Chen, G. Li und L. Wang. "Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of cohort studies". In: *International Journal of Cancer* 130.7 (2012), S. 1639–1648.
- [118] E. R. Weibel. "Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs (Abstract)". In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 12.Feb. (1963), S. 131–155.
- [119] E. R. Weibel, G. S. Kistler und W. F. Scherle. "Practical stereological methods for morphometric cytology." In: *The Journal of cell biology* 30.1 (1966), S. 23–38.
- [120] E. R. Weibel. "Stereological Principles for Morphometry in Electron Microscopic Cytology". In: *International Review of Cytology* 26.C (1969), S. 235–302.
- [121] U. Welsch. "Zelle". In: *Lehrbuch Histologie*. Hrsg. von U. Welsch. 3. Auflage. München: Elsevier GmbH, 2010. Kap. 2, S. 14–70.
- [122] A.-Q. Yang, D. Li, L. Chi und X.-S. Ye. "Validation, Identification, and Biological Consequences of the Site-specific O-GlcNAcylation Dynamics of Carbohydrate-responsive Element-binding Protein (ChREBP)". In: *Molecular & Cellular Proteomics* 16.7 (2017), S. 1233–1243.
- [123] W. H. Yiu, M. Lin und S. C. Tang. "Toll-like receptor activation: From renal inflammation to fibrosis". In: *Kidney International Supplements* 4.1 (2014), S. 20–25.

- [124] H. Zeng, H. Gu, C. Chen, M. Li, F. Xia, L. Xie, X. Liu, F. Zhang, X. Tong, J. Wang, Z. Yu und J. Zheng. “ChREBP promotes the differentiation of leukemia-initiating cells to inhibit leukemogenesis through the TXNIP/RUNX1 pathways”. In: *Oncotarget* 7.25 (2016), S. 38347–38358.
- [125] D. Zhang, X. Tong, K. Van Dommelen, N. Gupta, K. Stamper, G. F. Brady, Z. Meng, J. Lin, L. Rui, M. B. Omary und L. Yin. “Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity”. In: *Journal of Clinical Investigation* 127.7 (2017), S. 2855–2867.
- [126] P. Zhang, A. Kumar, L. S. Katz, L. Li, M. Paulynice, M. A. Herman und D. K. Scott. “Induction of the ChREBP $\beta$  isoform is essential for glucose-stimulated  $\beta$ -cell proliferation”. In: *Diabetes* 64.12 (2015), S. 4158–4170.
- [127] W Zhang, X Li und S.-G. Zhou. “Ablation of carbohydrate-responsive element-binding protein improves kidney injury in streptozotocin-induced diabetic mice.” In: *European review for medical and pharmacological sciences* 21.1 (2017), S. 42–47.
- [128] P. Ziegler. “die Nieren”. In: *Biochemie des Menschen*. Hrsg. von F. Horn. 7. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG, 2019. Kap. 31, S. 597–610.

## Anhang

### A Pathobiochemie beim Diabetes mellitus

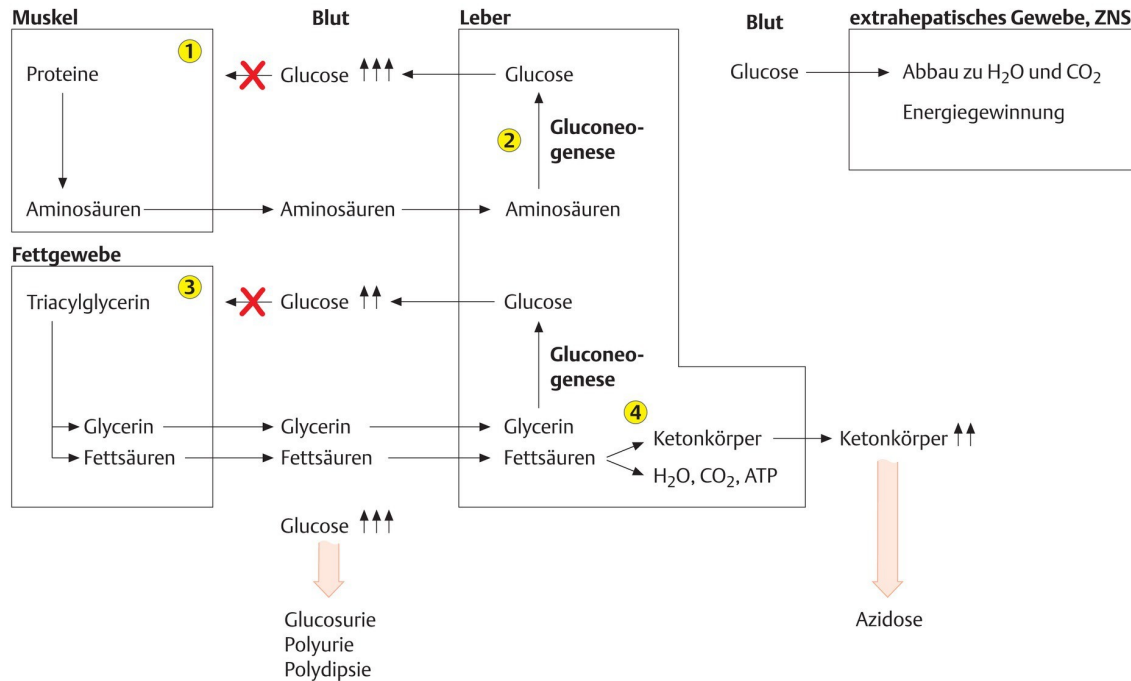


Abbildung A.1: Die wichtigsten pathobiochemischen Mechanismen beim Vorliegen eines Diabetes mellitus. Bei Insulinmangel oder zunehmender Insulinresistenz kann die Glukose nicht mehr vom Muskel- und Fettgewebe aufgenommen werden (1 und 3). Die Muskelzellen bauen aufgrund des Energiemangels ihre Proteine zu AS ab und setzen diese ins Blut frei (1). Diese gelangen zur Leber und werden dort von den Hepatozyten über die Glukoneogenese zu Glukose umgewandelt, durch deren Freisetzung der Blutglukosespiegel weiter steigt (2). Auch das Fettgewebe baut durch den Insulinmangel das eingelagerte Triacylglycerin zu Fettsäuren und Glycerin ab (3). Innerhalb der Leber werden diese wiederum zum einen über die Glukoneogenese zu Glukose verstoffwechselt (4). Zum anderen werden daraus Ketonkörper gebildet, die ins Blut abgegeben werden und zur Entstehung einer Azidose führen (4). Die daraus resultierende Hyperglykämie führt insbesondere zur Glukosurie, Polyurie sowie einem vermehrten Durstgefühl [57].

## B Score zur Überwachung des Wohlbefindens von Versuchstieren

Parameter	Untersuchung	Bewertung	Punkte
Erscheinungsbild	Inspektion	normales, gepflegtes Fell	0
		leicht gesträubtes Fell	1
		mäßig gesträubtes Fell	2
		dauerhaft gesträubtes Fell, Dehydratation	3
Atmung	Inspektion	normal	0
		beschleunigt	1
		schwer	2
		schwach	3
Gewichtsverlust	Wiegen	< 5%	0
		< 15%	1
		< 20%	2
		> 20%	3
Spontanverhalten	Beobachten	lebhaft, neugierig	0
		verlangsamt, sitzend	1
		träge, buckelige Haltung	2
		schwankender Gang	3
provoziertes Verhalten	Beobachten	Flucht bei Käfigöffnung	0
		Flucht bei Annäherung	1
		Flucht bei Berührung	2
		keine Flucht	3
Mundhöhle	Inspektion	rosige Schleimhaut	0
		Erosionen	1
		kleine Ulzera/Tumoren	2
		blutige Ulzera/Tumoren	3

Tabelle B.1: Bewertungskriterien und Punkteverteilung des Scores zur Überwachung des Wohlbefindens. Tiere mit einem Gesamt-Score von  $\geq 9$  oder einem Einzelwert von 3 werden aus dem Versuch genommen und getötet.



## C Herstellung der Perfusionslösungen

### C.1 Spüllösung

Tabelle C.2: Zusammensetzung der Spüllösung

Chemikalie	Hersteller	1 Liter	2 Liter	5 Liter
Dextran (FP40)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (Deutschland)	40 g	80 g	200 g
Procainhydrochlorid	Caesar und Loretz GmbH, Hilden (Deutschland)	5 g	10 g	25 g

- mit Ringer-Lösung auf entsprechende Endvolumen (1,2 oder 5l) auffüllen
- Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$
- vor Gebrauch filtrieren und pH auf 7,4 einstellen

### C.2 Fixationslösung

Tabelle C.3: Zusammensetzung der Fixationslösung

Chemikalie	Hersteller	1 Liter	2 Liter	5 Liter
Dextran (FP40)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (Deutschland)	40 g	80 g	200 g
Paraformaldehyd	Caesar und Loretz GmbH, Hilden (Deutschland)	30 g	60 g	150 g
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)	2,65 g	5,3 g	13,25 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)	13,9 g	27,8 g	69,5 g

- mit aqua dest. () auf 3/4 des Endvolumens (1,2 oder 5l) auffüllen
- unter Rühren auf  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzen, bis die Lösung klar wird
- nach dem Abkühlen aufs Endvolumen mit aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$
- vor Gebrauch 10 ml Glutaraldehyd (25 %, Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) pro 500 ml Lösung hinzugeben
- Filtrieren und pH auf 7,4 einstellen

### C.3 Nachfixationslösung

Tabelle C.4: Zusammensetzung der Nachfixationslösung

Chemikalie	Hersteller	1 Liter	2 Liter	5 Liter
Paraformaldehyd	Caesar und Loretz GmbH, Hilden (Deutschland)	30 g	60 g	150 g
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)	2,65 g	5,3 g	13,25 g
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)	13,9 g	27,8 g	69,5 g

- mit aqua dest. auf 3/4 des Endvolumens (1,2 oder 5l) auffüllen
- unter Rühren auf 70 °C erhitzen, bis die Lösung klar wird
- nach dem Abkühlen aufs Endvolumen mit aqua dest. auffüllen
- Lagerung bei -20 °C
- vor Gebrauch 10 ml Glutaraldehyd (25 %, Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) pro 500 ml Lösung hinzugeben
- Filtrieren und pH auf 7,4 einstellen

## D Protokoll zur Durchführung der PAS-Reaktion

- Allgemeines
  - normale Objektträger verwenden
  - mehrere Schnittdicken wählen
  - über Nacht bei 37 °C lagern
- Ablauf
  - Perjodsäure 1 %; 10 min.
  - Spülung mit aqua dest., 2 bis 3x
  - aqua dest., 3 min.
  - Schiff'sches Reagenz; 30 min. im Wasserbad (37 °C)
  - Schwefelwasser auf Schüttler; 9 min.
    - \* Schwefelwasser: 450ml H<sub>2</sub>O, 15 ml HCl (1N), 15ml Kaliummetabisulfid
  - Spülung mit Leitungswasser (fließend); 10 min.
  - Kernfärbung mit Hämalaun, 2min.
  - aufsteigende Alkoholreihe
  - Xylol
  - mit Roti-Histokitt eindecken

## E Protokoll zur Durchführung der BrdU-Reaktion (mit PAS-Reaktion)

- Tag 1
  - langsames Entparafinieren mit
    - \* Xylol; 5 min.
    - \* Alkohol, 3 min.
    - \* aqua dest., 5 min.
  - PAS-Reaktion durchführen
    - \* Perjodsäure 1 %; 10 min.
    - \* Spülung mit aqua dest., 2 bis 3x
    - \* aqua dest., 3 min.
    - \* Schiff'sches Reagenz; 30 min. im Wasserbad (37 °C)
    - \* Schwefelwasser auf Schüttler; 9 min.
      - Schwefelwasser: 450ml H<sub>2</sub>O, 15 ml HCl (1N), 15ml Kaliummetabisulfid
    - \* Spülung mit Leitungswasser (fließend); 10 min.
  - Citratpuffer ansetzen
    - \* Zitronensäure (0,1M); 18 ml
    - \* Natriumcitrat (1M); 82 ml
    - \* aqua dest.; 1000 ml
    - \* mit Puffer pH auf 6,0 einstellen
      - Puffersubstanzen: Citronensäure-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland), tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland)
    - \* aqua dest. auf Schüttler, 5min.
    - \* Citratpuffer im Schnellkochtopf zum Sieden bringen
    - \* OT im Ständer hinzufügen
    - \* Druckaufbau; 3 min. bei Stufe 8.5
    - \* Dampfablass (unter kaltem Wasser)
    - \* Decke öffnen und
      - Abkühlen lassen; 20 min.
      - aqua dest. auf Schüttler, 5 min.
      - Proteinase bacterial (0,075 g/100 ml; Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland) inkubieren; 10 min. im Wasserbad (37 °C)
      - aqua dest. auf Schüttler, 5 min.
      - Formamid 95 % (deionisiert, Carl-Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe/Deutschland); 60 min. im Wasserbad (70 °C)
      - Trispuffer hinzugeben, für 1l: 900 ml aqua dest., 100 ml Tris-Stammlösung (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland), 200 µl Tween-20 (Sigma-Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt/Deutschland)
      - Einbau der OT in Coverplate-Schienen
      - mit Trispuffer spülen; 5 min.
      - Peroxidase-Block („Novocastra“, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch/Deutschland); 3xTropfen/Schnitt, 30 min.

- Spülung mit Trispuffer; 5min.
  - Schweinenormalserum (SNS) mit Trispuffer (Verhältnis 1:5); für 30 Proben= 800 µl SNS (Agilent Technologies, Santa Clara/USA), 3200 µl Trispuffer
  - BrdU-Antikörper (Verhältnis 1:50) hinzugeben; für 30 Proben= 3920 µl Antibody Diluent (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim/Deutschland), 80 µl BrdU-Ak (Monoclonal Mouse Anti-Bromodeoxyuridine Clone Bu20a; Agilent Technologies, Santa Clara/USA)
- Tag 2
    - Spülung mit Trispuffer; 5min.
    - biotinylated LINK (Agilent Technologies, Santa Clara/USA); 30min.
    - Spülung mit Trispuffer; 5min.
    - Streptavidin-POD-Komplex, 30min.
    - Spülung mit Trispuffer; 5min.
    - DAB (inkl. Substratpuffer und Chromogen; Agilent Technologies, Santa Clara/USA); 15min.
    - Spülung mit aqua dest.; 5min.
    - Kernfärbung mit Hämalaun
    - Bläuen in warmen Leitungswasser
    - aufsteigende Alkoholreihe
    - Xylol und Eindecken mit Roti-Histokitt

## F allgemeine Versuchsmaterialien I

Tabelle F.5: allgemeine Versuchsmaterialien I

Produktbezeichnung	Hersteller	Herkunft	Funktion
Einwegspritzen BD Plastic <sup>TM</sup> 1 ml	Becton Dickinson S.A.	Madrid, Spanien	Transplantation und Perfusion (Narkose, Tx-System)
Einwegspritzen BD Plastic <sup>TM</sup> 5 ml	Becton Dickinson S.A.	Madrid, Spanien	Transplantation (Pankreas isolation)
Einwegspritzen BD Plastic <sup>TM</sup> 20 ml	Becton Dickinson S.A.	Madrid, Spanien	Transplantation (Pankreas isolation)
Kanülen BD Microlance <sup>TM</sup> 3, 26 G 3/8	Becton Dickinson and Company Limited	Drogheda, Irland	Transplantation, Perfusion (Narkose)
sterile Einweg-Subkutannadeln AGANI <sup>TM</sup> NEEDLE	Shanghai International Holding Corp. GmbH (Europe)	Hamburg, Deutschland	Transplantation (Tx-System)
Rasierklingen Croma®Blades, Klingenstärke 0,1mm	Feintechnik GmbH Eisfeld	Eisfeld, Deutschland	Transplantation (Pankreas isolation), Perfusion (Probengewinnung) und Zchnitt
Punktionskanüle Venofix®A, orange, G25, 0,50 x 15 mm	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland	Transplantation (Pankreas isolation)
Wecker	Carl-Roth-GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland	Transplantation, Perfusion (Zeitmessung)
Brutschrank (37,5 °C)	Heraeus/Thermo Electro Corporation	Langensfeld, Deutschland	Transplantation (Enzymatischer Verdau, Lagerung)
Vortexer	neolab®	Heidelberg, Deutschland	Aufbereitung von Streptozotocin und BrdU
Glaspipetten (Disposable Glass Pasteur Pipettes), Diameter: 7mm	vwr® International	Radnon, USA	Transplantation (Insel isolation)
Stereomikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH	Wetzlar, Deutschland	Transplantation (Insel isolation)
Stereomikroskop	Olympus Biosystems GmbH	Planegg, Deutschland	Transplantation (Insel isolation)
Blutzuckermessgerät PerformaAccu-Chek®	Accu-Chek	Mannheim, Deutschland	BZ-Messung
Blutzucker-Teststreifen Accu-Chek Inform II	Accu-Chek	Mannheim, Deutschland	BZ-Messung
Kaltlichtquelle KL1500 electronic	Schott Elektrotechnik	Mannheim, Deutschland	Transplantation (Insel isolation)
Kaltlichtquelle KL2500 LED	Olympus Biosystems GmbH	Planegg, Deutschland	Transplantation (Insel isolation)
Pipettierhilfe micro-classic	Brand GmbH und Co. KG	Wertheim, Deutschland	Transplantation (Insel isolation)
Handzähler	Conrad Electronic	Berlin, Deutschland	Transplantation (Gewinnung von Pankreas Inseln)
Rührplatte MonoVariomag®	H und P Labortechnik AG	Oberschleißheim, Deutschland	Herstellung Chemikalien
Einweg-Plastikpipetten, 3,5 ml	Sarstedt AG und Co. KG	Nümbrecht, Deutschland	Herstellung Chemikalien
pH-Elektrode SenTix®81	Xylem Analytics Germany Sales GmbH und Co. KG	Weilheim, Deutschland	Herstellung Chemikalien
pH-Meter inolab	Xylem Analytics Germany Sales GmbH und Co. KG	Weilheim, Deutschland	Herstellung Chemikalien
Centrifuge 5415D, ≥ 10.0 x 1000 rpm	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH	Hamburg, Deutschland	Perfusion (Serumgewinnung)
Waage EMB 500-I	Kern und Sohn GmbH	Balingen, Deutschland	wiegen (Maus)
Feinwaage FZ-300i-EC	A und D Instruments, Limited	Abington, Großbritannien	Herstellung Chemikalien
Operationsleuchte Mach 130	Dr. Mach	Ebersberg, Deutschland	Beleuchtung OP-Tisch
Serumgefäße Cryo S <sup>TM</sup>	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland	Perfusion (Serumgewinnung)
Einwegplastikbecher (mit Deckel, klein)	Sarstedt AG und Co. KG	Nümbrecht, Deutschland	Perfusion (Probenaufgewahrung)
Eppendorfpipette Reference, 100 µl	Kinesis GmbH	Langenfeld, Deutschland	Perfusion (Serumgewinnung)
Eppendorf Pipettenspitzen	Kinesis GmbH	Langenfeld, Deutschland	Perfusion (Serumgewinnung)
Papierstreifen	Vogel GmbH und Co. KG	Gießen, Deutschland	Perfusion (Kryokonservierung)
Pipettierball	Carl-Roth-GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland	Transplantation (Spülung)
Autoklavierband	LabWare	Weinheim, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Fixierung)
Steri Drape <sup>TM</sup>	3M Health Care	Neuss, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Operationstuch)
Kühlschrank (4,2 °C) ML 305C	B Medical Systems	Houson, Luxemburg	Lagerung (Proben, Chemikalien)
Gefrierschrank (-22,0 °C)	B Medical Systems	Houson, Luxemburg	Lagerung (Proben, Chemikalien)
Gefriertruhe (-44,0 °C) Profiline	Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach, Deutschland	Lagerung (Proben, Chemikalien)

## F.1 allgemeine Versuchsmaterialien II

Tabelle F.6: allgemeine Versuchsmaterialien II

Produktbezeichnung	Hersteller	Herkunft	Funktion
Bunsenbrenner Campinggaz® Labogaz 470 Wattestabchen Best premium	Camping Gaz GmbH Consumer Medical Care	Hattersheim, Deutschland Sontheim/Brenz, Deutschland	Transplantation (Inselisolation) Transplantation und Perfusion (Operation)
sterile Mullkompressen Fuhrmann, 17-fädig aus Baumwolle, 10x10cm, DIN EN 14079	Fuhrmann GmbH	München, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Operation)
unsterile Mullkompressen Fuhrmann, 17-fädig aus Baumwolle, 10x10cm, DIN EN 14079	Fuhrmann GmbH	München, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Operation)
Schlingzangentupfer	Fuhrmann GmbH	München, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Operation)
Venenverweilkatheter mit Flügeln BD- Insyste-N, gelb, 24 G, 0.7x14 mm	Becton Dickinson Infusion Therapy Systems	Utah, USA	Perfusion
Skalpellklinge	Feather Safety Razor Co., Ltd.	FKita-Ku, Japan	Transplantation (Hautschnitt)
Faden MARILON® aus Polyvinylidenfluorid, monofil, nicht resorbierbar, blau, 5/0 USP, 45cm	Catgut GmbH	Markneukirchen, Deutschland	Transplantation (Peritonealnaht)
Wundklammern Michel, 7.5 x 1.75 mm	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland	Transplantation (Hautverschluss)
Rasierer Electra II GH 204	Aesculap AG	Tuttlingen, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Haar- rasur Bauchdecke)
Einweghandschuhe Peha-Soft nitril	Paul Hartmann AG	Heidenheim, Deutschland	Transplantation und Perfusion, Tier- haltung
Nitrilhandschuhe (chemoresistent)	Kirchhoff Group Deutsch- land	Hamburg, Deutschland	Herstellung Chemikalien
Schutzhandschuhe Cryogloves®	Tempshield Cryo Protecti- on, INC	Trenton, USA	Arbeiten mit Stickstoff
Mundschutz	3M Health Care	Minnesota, USA	Transplantation und Perfusion, Her- stellung Chemikalien
Schutzbrille Armamax	Honeywell Safety Products Deutschland GmbH und Co. KG	Lübeck, Deutschland	Herstellung Chemikalien
Impfösen	nerbe plus	Winsen/Luhe, Deutsch- land	Transplantation (Blutstillung)
Manuelle Pipettierhilfe	Carl-Roth-GmbH und Co. KG	Karlsruhe, Deutschland	Transplantation (Spülung)
Filterpapier	Whatman™ GE Health- care Lifesciences	München, Deutschland	Perfusion (Herstellung Chemikalien)
Heidelberger-Extension-Type Verlänge- rungsleitung, Größe: 30 cm, 1.2 x 2.2 mm	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland	Transplantation (Tx-System)
Intrafix® Primeline	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland	Perfusion (Infusionsbesteck)
alzet® mini osmotic pump 2001, 1,0 µl/h, 200 µl	Charles River Laboratories	Wilmington, USA	Perfusion (BrdU-Applikation)
Hitzesterilisator Sterilisator 205	Melag Medizintechnik	Berlin, Deutschland	Transplantation (Sterilisation OP- Besteck)
Parafilm „M“	Pechiney Plastic packa- ging	Chicago, USA	Transplantation (Abdeckung HANKS)
Terrarium Heizmatte „Terra Mat 20“, 20W, 42x28 cm	GarPet GmbH und Co. KG	Cadolzburg, Deutschland	Wärmeerhalt
Terrarium Heizmatte „Terra Mat 5“, 5W, 14x15 cm	GarPet GmbH und Co. KG	Cadolzburg, Deutschland	Wärmeerhalt
Leica DMRB 301	Leica Mikrosysteme Ver- trieb GmbH	Wetzlar, Deutschland	Auswertung der histologischen Präpa- rate
Nikon DS-Fi1	Nikon Corporation	Tokio, Japan	Auswertung der histologischen Präpa- rate

## G Materialien: Tierhaltung

Tabelle G.7: Tierhaltung

Bezeichnung	Hersteller	Herkunft	Funktion
Käfig aus Makrolon (Typ3), Bodenfläche: 800cm <sup>2</sup> , Höhe: 150 mm	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Käfig aus Makrolon (Typ2), Bodefläche: 350cm <sup>2</sup> , Höhe: 140mm	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Standardkäfigdeckel DST3	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Standardkäfigdeckel DST2	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Tränkflasche aus Makrolon (F75), Volumen:750ml	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Tränkflasche aus Makrolon (F50), Volumen: 500ml	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Tränkkappe (TR 25/1,8), Kanüle:25mm, Bohrung:1,8mm	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Silikondichtungsring für Tränkflasche SDR1	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Trennblech für Futterraufe (TB3)	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Trennblech für Futterraufe (TB2)	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Maus-Häusschen aus Polycarbonat, Farbe: rot, transparent	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Gestell (G3e/24L) für 24 Makrolonkäfige (Typ 3)	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Gestell (Le/30L) für 30 Makrolonkäfige (Typ 2)	FA Zoonlab (ehemals EBECO)	Castrop-Rauxel, Deutschland	Tierhaltung
Verbandzellostoff, ungebleicht	Universitätsmedizin Greifswald	Greifswald, Deutschland	Tierhaltung
Maus-Zuchtfutter, 10mm	ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest, Deutschland	Tierhaltung
Maus-Haltungsfutter, 10mm	ssniff Spezialitäten GmbH	Soest, Deutschland	Tierhaltung
Einstreu für Kleintiere, Grade: 5, Material: Fichte, Faser/Fibre: 1,0-2,5 mm, Bulk Density: 120-140 g/L	ssniff Spezialitäten GmbH	Soest, Deutschland	Tierhaltung

## H Materialien: Operationsbesteck

Tabelle H.8: Operationsbesteck

Produkt	Hersteller	Herkunft	Artikel-Nr.	Funktion
anatomische Pinzette, mittelbreit, Größe: 115mm, 4 1/2	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BD023R	Transplantation, Perfusion
anatomische Pinzette, mittelbreit, Größe: 130mm, 5 1/8	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BD025R	Transplantation, Perfusion
chirurgische Pinzette, mittelbreit, 1x2 Zähne, Größe: 120mm, 4 3/4	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BD506R	Transplantation, Perfusion
Irispinzette, stark gebogen, sehr fein, spitz, Größe: 100mm, 4	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	OC026R	Transplantation, Perfusion
Irispinzette, stark gebogen, sehr fein, stumpf, Größe: 100mm, 4	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	OC026R	Transplantation, Perfusion
Anlege-/Abnhemzange, Größe: 125mm, 5	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BN750R	Transplantation, Perfusion
Schere, fein, gerade, spitz/spitz, Größe: 105mm, 4 1/8	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BC060R	Transplantation, Perfusion
Gefäßschere, 1 Blatt geknöpft, Größe: 120mm, 4 3/4	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BC060R	Transplantation, Perfusion
Skalpellegriff(Aufnahme No. 3 für Klängen Figur 10-15 und 40,42), Größe: 125mm, 5	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BB073R	Transplantation, Perfusion
Bulldogklemme, gewinkelt, Maullänge: 20 mm, Gesamtlänge: 34mm	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BH030R	Transplantation, Perfusion
Durogrip Nadelhalter, Größe: 130mm, 5 1/8	Aesculap AG	Tüttlingen, Deutschland	BM012R	Transplantation, Perfusion
Mikro-Präparierschere aus Wironit, gerade, spitz/spitz, Größe: 130mm, 5 1/8	Karl Hammacher GmbH	Solingen, Deutschland	HWB 002-11	Transplantation, Perfusion



## I Materialien: Chemikalien I

Tabelle I.9: Chemikalien I

Bezeichnung	Zusammensetzung	Identifikation	Hersteller	Funktion
Bode Bacilloid ® 25	1-Propanol (45g), 2-Propanol (25g), Ethanol (4,7g)	REF: 92385, PZN: 7438053	BODE Chemie, Hamburg, Deutschland	Flächendesinfektion
–	Ethanol 70 Vol.-%	–	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland	Transplantation und Desinfektion
–	Ethanol 96 Vol.-%	Index: 603-002-00-5	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland	Transplantation und Desinfektion
H17073L Protein Cleaning Solution Set	–	Lot: 50017/17	Hanna Instruments SRL Com., Salaj, Rumänien	Transplantation und Perfusion (Säuberung des pH-Meters)
B. Braun NaCl 0,9 %	Natriumchlorid (9g/ 1000ml)	Lot: 171248001	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Neutralrot-Lösung, Säuberung, Feuchtigkeitserhalt)
Ketamin 10 %- Injektionslösung	Ketaminhydrochlorid (100 mg/ml)	Ch.B.: H4114-10, Zul.Nr.: 9089.01.00	Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling, Deutschland	Transplantation, Perfusion (Narkose, Analgesie)
Lin βIT® Lin βIT®-Insulinimplantate	–	U.S.-Patent-Nr.: 5939380	Linshin Canada Inc., Toronto, Kanada	Insulinstick-Implantation
Natriumhydroxid-Lösung 99 %	Natriumhydroxid	Art.Nr.: 6771.1, Ch.B.: 054209415	Carl-Roth-GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Transplantation und Perfusion (pH-Einstellung von HANKS, Spül- und Fixationslösungen)
Novaminsulfon ratiopharm ®	Metamizol-Natrium (500mg/ml)	Ch.B.: R378662, Zul.Nr.: 6137816.00.00	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland	Analgesie
Potassium chloride solution	Kaliumchlorid	Lot: HC67083717	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Analgesie
ROTIPIURAN ≥ 99,5 % ®	Diethylether	Ch.B.: 406247625	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Narkose
Salzsäure	HCl 37 % (rauchend)	Lot: K48518817 650	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Transplantation und Perfusion (pH-Einstellung von HANKS, Spül- und Fixationslösungen), Zuschnitt (Pufferlösung)
Sensiva ®	1-Propanol (Ph.Eur.) 45.0g/100g, 2-Propanol (Ph.Eur.) 28.0 g/100g, Milchsäure (Ph.Eur.) 0.3g/100g	Ch.B.: 1280424, Art.Nr.: 115203	Schülke Mayr GmbH, Nordstedt, Deutschland	Transplantation und Perfusion (Desinfektion)
Xylasel Injektionslösung	Xylazinchlorid (20mg/ml)	Ch.B.: 1570150A	Dr. Otto Fischer GmbH, Weyan-Holzolling, Deutschland	Narkose
Hank's balanced salt solution, 10X CMF-HBSS concentrate	CMF-HBSS	Lot: RNBF1803	SIGMA Life Science ALD-RICH, St. Louis, USA	Transplantation (HANKS, Nährlösung für isoliertes Pankreasgewebe)
Plastipur®-Spüllösung	Aqua ad iniectionem	Ch.B.: 13LAP061	Fresenius Kabi France, Sevres, Frankreich	Transplantation und Perfusion (Lösung für HANKS, Fixation und Nachfixation), Zuschnitt (Pufferlösung)
Neutralrot-Lösung	Neutralrot (10g/500ml)	Ch.B.: 306247424	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Transplantation (Anfärbung der Pankreasinseln)
Mini-Plasco® connect-Injektionslösung	Natriumchlorid 0.9 % (0.09g/10ml)	Ch.B.: 17035011, Zul.Nr.: 6697366.00.00	Braun AG, Melsungen, Deutschland	Transplantation (sterile Spüllösung)
Collagenase NB8 Broad Range	Collagenase NB8 Broad Range (aus Clostridium histolyticum)	Lot: 150842, EC: 232-582-9, CAS: 9001-12-1	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Transplantation (Enzymatischer Verdau des Pankreasgewebe)
Albumin bovine cryst. lyophil.	Albumin bovine cryst. lyophil.	Lot: 150969, EC: 232-936-2, CAS: 9048-46-8	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Transplantation (Enzymatischer Verdau des Pankreasgewebe)
2-Methylbutan ≥ 99 %	2-Methylbutan ≥ 99 %	Ch.B.: 436250995	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Perfusion (Kryokonservierung)

## I.1 Chemikalien II

Tabelle I.10: Chemikalien II

Bezeichnung	Zusammensetzung	Identifikation	Hersteller	Funktion
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin $\geq$ 99 %	Lot: HMBF6912V, CAS: 59-14-3, EC-Nr.: 200-415-9	SIGMA Life Science ALD-RICH, St. Louis, USA	Perfusion (Anfärbung mitotischer Zellen)
Natriumkakodylat	Sodium cacodylate trihydrate, 0.1 mol (pH = 7.4)	Lot: 130182, CAS: 6131-99-3, EC-Nr.: 204-708-2	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Perfusion (Fixation), Zugschnitt (Pufferlösung)
Dextran FP40	Dextran FP40	Lot: 161077, CAS: 9009-54-0, EC-Nr.: 232-677-5	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Perfusion (Spülung und Fixation)
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd	Art.Nr.: 0335.3, Ch.B.: 31898748	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation)
EMPROVE® ESSENTIAL BP, USP	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Ch.B.: A998546 844	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation), Zugschnitt (Pufferlösung)
EMPROVE® EXPERT Ph Eur, BP, USP	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Lot: K43237480 230	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation) Zugschnitt (Pufferlösung)
Glutaraldehydlösung 25 %	Glutaraldehydlösung 25 %	Art.Nr.: 4157.1, Ch.B.: 365233969	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation), Zugschnitt (Probenkonservierung)
Formaldehydlösung 4.5 %	Formaldehyd 4.5 %	Art.Nr.: 4157.1, Ch.B.: 365233969	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland	Perfusion (Probenkonservierung), Zugschnitt (Probenkonservierung)
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd	Art.Nr.: 4157.1, Ch.B.: 365233969	Universitätsapotheke Greifswald, Greifswald, Deutschland	Perfusion (Fixation und Nachfixation)
Procainhydrochlorid	Procainhydrochlorid	Ch.B.: 60998467, Art.Nr.: 2553	Caesar und Loretz GmbH, Hildesheim, Deutschland	Perfusion (Spülung)
Ringer B. Braun-Spüllösung	Natriumchlorid (8.60g/1000ml), Kaliumchlorid (0.30g/1000ml), Kaliumchlorid 2H <sub>2</sub> O (0.33g/1000ml)	Lot: 164758001	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	Perfusion (Spülung)
Stickstoff	Stickstoff	Nr.: 9927, DEA90J167	Universitätsmedizin Greifswald, Greifswald, Deutschland	Perfusion (Kryokonservierung)
Osmiumtetroxid $\geq$ 99,95 %	OsO <sub>4</sub>	Ch.B.: 276245913, Art.Nr.: 8371.3	Carl-Roth-GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Perfusion (Aufbereitung für Elektronenmikroskopie)
Sudan (IV-) Farbstofflösung	Sudanrot	Ch.B.: 1011	Dr. K. Hollborn und Söhne, Leipzig, Deutschland	Zugschnitt (Anfärbung von makroskopischen Leberherden)
Backpulver „Original Backin“	E 450 Diphosphate, Natriumcarbonat E500, Stärke	—	Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld, Deutschland	Transplantation (Tx-System)
Sekundenkleber „UHU-Mimis“, flüssig, Einkomponenten-Reaktionsklebstoff	Cyanacrylsäureethylester	—	UHU GmbH und Co.KG, Bühl, Deutschland	Transplantation (Tx-System)
EPON-Härter MNA	Methylnadicanhydrid	CAS: 25134-21-8	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil des Epoxidharzes
EPON-Härter DDSA	2-Dodecylbernsteinsäureanhydrid	CAS: 26544-38-7	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil des Epoxidharzes
Glycidether 100	1,2,3-Propantriolglycidylether	CAS: 90529-77-4	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil des Epoxidharzes
EPON-Beschleuniger	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)-phenol	CAS: 90-72-2	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Bestandteil des Epoxidharzes
Paraplast PLUS	Paraffin	Artikelnummer: X881	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland	Einbettung der Gewebe

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Frank Dombrowski und Frau Prof. Dr. Silvia Ribback für die Überlassung des Themas und Betreuung während der Durchführung der Experimente und des Verfassens dieser Arbeit bedanken.

Außerdem danke ich Frau Ines Zimak für die Pflege der Tiere und Frau Stefanie Bockhahn für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Zudem möchte ich mich bei den medizinisch technischen Assistent\*innen des pathologischen Instituts für die Anfertigung der histologischen Präparate bedanken.

Schließlich möchte ich mich herzlich bei dem Institut für Bioinformatik unter der Leitung von Prof. Dr. Lars Kaderali für die Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Daten bedanken.